

ISSN 1029-8940 (Print)
 ISSN 2524-230X (Online)
 УДК 579.22
<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-3-292-301>

Поступила в редакцию 16.10.2018
 Received 16.10.2018

О. В. Евдокимова¹, М. А. Чиндарева², Л. Н. Валентович^{1,2}

¹Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь
²Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

ХАРАКТЕРИСТИКА ПЛАЗМИД БАКТЕРИЙ *BACILLUS PUMILUS*, ИЗОЛИРОВАННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ БЕЛАРУСИ

Аннотация. В клетках природных бактерий *Bacillus pumilus* выявлены плазмиды размером от 6,2 до 8,5 т. п. н., копирующиеся в соответствии с механизмом «катящегося кольца» (RCR-типа) семейства pC194. Показано, что данные внехромосомные элементы достаточно широко распространены среди бактерий *B. pumilus*, циркулирующих на территории Беларуси (19 штаммов из 41 исследованного содержат RCR-плазмиды), и характеризуются генетическим полиморфизмом. Наиболее часто встречаются внехромосомные генетические элементы размером 7,7 т. п. н., идентичные плазмиде pBp15.1S из энтомопатогенного штамма *B. pumilus* 15.1. Остальные 6 вариантов плазмид отличаются друг от друга и от известных внехромосомных генетических элементов бактерий рода *Bacillus*. В клетках исследованных бактерий не выявлено репликонов, подобных pLS20.

Ключевые слова: *Bacillus pumilus*, плазмиды, RCR-тип репликации, тета-тип репликации

Для цитирования: Евдокимова, О. В. Характеристика плазмид бактерий *Bacillus pumilus*, изолированных на территории Беларуси / О. В. Евдокимова, М. А. Чиндарева, Л. Н. Валентович // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 2019. – Т. 64, № 3. – С. 292–301. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-3-292-301>

O. V. Evdokimova¹, M. A. Chindareva², L. N. Valentovich^{1,2}

¹Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus
²Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

CHARACTERISTIC OF PLASMIDS OF *BACILLUS PUMILUS* ISOLATED IN BELARUS

Abstract. In current study plasmids (size from 6.2 to 8.5 kb) copied with the “rolling circle” mechanism (RCR type) of the pC194 family have been identified in environmental bacteria *Bacillus pumilus*. It is shown that these extrachromosomal elements are widely distributed in *B. pumilus* bacteria circulating on the territory of Belarus (19 strains from 41 contain RCR-plasmids) and they are characterized by genetic polymorphism. The most common extrachromosomal genetic elements (7.7 kb size) are identical to the plasmid pBp15.1S from the entomopathogenic strain *B. pumilus* 15.1. The remaining 6 type of plasmids differ from each other and from the known extrachromosomal genetic elements of genus *Bacillus*. In the investigated bacteria no replicons similar to pLS20 were detected.

Keywords: *Bacillus pumilus*, plasmids, rolling circle replication, theta mechanism of replication

For citation: Evdokimova O. V., Chindareva M. A., Valentovich L. N. Characteristic of plasmids of *Bacillus pumilus* isolated in Belarus. *Vesti Natsyynal'noi akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2019, vol. 64, no. 3, pp. 292–301 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-3-292-301>

Введение. Широко распространенные грамположительные бактерии *Bacillus pumilus* представляют довольно разнофункциональную группу микроорганизмов, включающую биотехнологически перспективные штаммы [1–4]. В то же время некоторые штаммы этого вида являются патогенами для животных и растений [5–8]. Такое разнообразие свойств бактерий обусловлено особенностями их генетической организации, изучение которой предполагает комплексное исследование всех наследственных структур, в том числе и внехромосомных генетических элементов. Именно плазмиды, наряду с бактериофагами и транспозонами участвуя в горизонтальном переносе генов, обеспечивают быстрое изменение свойств бактерий, позволяя им существовать в разных условиях внешней среды. Несмотря на значимость в жизнедеятельности микробных клеток, данные генетические структуры у бактерий *B. pumilus* практически не изучены. В литературе и в банках данных нуклеотидных последовательностей приводится информация о 19 плаزمиде, содержащихся в клетках указанных микроорганизмов (табл. 1). Для изученных плазмид

показано, что они могут копироваться в соответствии с механизмом тета-типа (плазмиды размером более 40 т. п. н.) либо «катыщегося кольца» (плазмиды размером до 10 т. п. н.) и содержат генетические детерминанты, определяющие отдельные этапы метаболизма и клеточного цикла [9, 10].

Систематический анализ природных бактерий *B. pumilus* на присутствие плазмид представляется важным этапом в изучении особенностей генетической организации данных функционально разнообразных микроорганизмов.

Т а б л и ц а 1. Плазмиды бактерий *B. pumilus*

Т a b l e 1. Plasmids of *B. pumilus* bacteria

Плаزمида	Штамм	Размер, п. н.	Ссылка	Код доступа в ГенБанке, год депонирования
pPL7065	<i>B. pumilus</i> ATCC 7065	7607	[11, 12]	AY230134.1, 2003
pMB1, pMB2	<i>B. pumilus</i> ATCC 12140	–	[13]	–
pPL10	<i>B. pumilus</i> L10; мутант, полученный из <i>B. pumilus</i> ATCC 12140	7028	[14]	AF036712, 1997
pSH1452	<i>B. pumilus</i> SH1452; солеустойчивый штамм	6081	[15]	U53767.1, 1996
pMMH1	<i>B. pumilus</i> MJM1; продуцент полиглутаминовой кислоты, изолированный из почвы	5812	Не опубликовано	AY522951.1, 2003
pPZZ84	<i>B. pumilus</i> ZZ84, выделенный из образца щелочной почвы	6817	[16]	GU144016, 2009
pBP6000	<i>B. pumilus</i> 201005130501	5664	Не опубликовано	KC683537.1, 2013
pGR8	<i>B. pumilus</i> GR-8; патоген, вызывающий гниль корневищ имбиря	6935	[17]	CP009109.1, 2014
pBp15.1S	<i>B. pumilus</i> 15.1; этнопатогенный штамм	7785	[10]	KM348008.1, 2014
pPDSLzg-1	<i>B. pumilus</i> PDSLzg-1; деградирующий углеводород штамм, выделенный из нефтеносных песков	11 801	[18]	CP016785, 2016
pCB01	<i>B. pumilus</i> CB01, изолированный из фекалий американского ворона	7295	Не опубликовано	LYXP01000016.1, 2016
pC2-2	<i>B. pumilus</i> C2-2 (MCCC 1A08151); штамм из придонных отложений Атлантического океана	5899	Не опубликовано	MF503687.1, 2017
pGLB197	<i>B. pumilus</i> GLB197; эндофитный штамм, изолированный из здоровых листьев виноградной лозы	7061	Не опубликовано	CP018575.1, 2017
pGM3FR	<i>B. pumilus</i> GM3FR; эндофит, выделенный из тканей растений овсяницы красной	6565	[19]	MKZN01000029, 2017
p576	<i>B. pumilus</i> NRS576	43 434	[9, 20, 21]	–
pMGD296	<i>B. pumilus</i> 296.51; штамм, изолированный из сена	~42 000	[22]	–
pMGD302	<i>B. pumilus</i> 302.41; штамм, изолированный из сена	~60 000	[23]	–
pSHB9	<i>B. pumilus</i> SH-B9; штамм, изолированный из ризосферы сахарной свеклы	91 229	Не опубликовано	CP011023.1, 2016

Цель настоящей работы – изучение распространения определенных типов плазмид в клетках природных бактерий *B. pumilus*, циркулирующих на территории Беларуси.

Материалы и методы исследования. Объектами исследования являлся 41 штамм природных бактерий *B. pumilus*, выделенных из различных источников на территории Беларуси: T1, T2, 19.6, 32.7, 32.8, 33.4, 33.5, 36, 36.2, 37.7, 38.2, 39.2, 39.3, 40.2, 41.2, 44.2, 51.2, 61.2, 61.3, 11-1-1, 17-2, 21-3, 33-3, 65-4, 43-3-1, 63-1-3, 6-5-2, 63-2-2, 71-4-1, 1MRL, F6, БИМ В-171, БИМ В-211, БИМ В-369, БИМ В-373, БИМ В-394, БИМ В-401, P10, P107, P109, P110 [24]. Таксономический статус исследуемых бактерий подтвержден с помощью видоспецифичной ПЦР [25]. В работе также использовали коллекционные штаммы *B. subtilis* 168 [26], 19 [27], LS20 [28] и *B. safensis* U17-1 (ГенБанк: CP015611). Фрагменты ДНК клонировали в составе вектора pJET1.2 (Thermo Scientific, Литва) в бактериях *Escherichia coli* XL1-Blue [29].

Для культивирования бактерий использовали жидкую и агаризованную среду LB (LENNOX) (Conda, Испания), бактерии выращивали в течение 16–18 ч при температуре 28 °С (*E. coli* при температуре 37 °С).

Для выделения тотальной ДНК использовали набор реактивов «Нуклеосорб С» (ОДО «Праймтех», Беларусь). Плазмидную ДНК выделяли методом щелочного лизиса [30]. В обоих случаях суспензии клеток предварительно обрабатывали лизоцимом в концентрации 2 мг/мл. Рестрикцию и лигирование ДНК осуществляли согласно рекомендациям фирмы – производителя ферментов (ThermoScientific, Литва). Электропорацию бактерий *E. coli* XL1-Blue проводили согласно инструкциям, изложенным в руководстве к электропоратору MicroPulser™ Electroporator (Bio-Rad Laboratories, США). Секвенирование осуществляли по методу Сэнгера [31] с помощью набора реактивов DNA Cycle Sequencing Kit (Jena Bioscience GmbH, Германия) и меченных флуоресцентной меткой Cy5.5 праймеров pJET-F (5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC-3') и pJET-R (5'-AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG-3') (ОДО «Праймтех», Беларусь). Продукты секвенирующей реакции детектировали с помощью автоматического секвенатора 4300 DNA Analyzer (Li-COR Biosciences, США). Анализ нуклеотидных последовательностей осуществляли с помощью компьютерных программ eSeq V.3.1.10 (Li-COR Biosciences, США), BLASTN 2.2.1 (NCBI сайт: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) и базы данных ГенБанк (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

Для проведения ПЦР использовали реактивы производства (ОДО «Праймтех», Беларусь). Реакционная смесь (20 мкл) содержала 50 нг ДНК матрицы, 400 мкМ каждого праймера, 200 мМ дНТФ, 1,5 мМ MgCl₂, 0,5 ед. *Taq*-полимеразы и буфер «АМ».

Аmplификацию *rep*-областей плазмид RCR-типа размером порядка 240 п. н. проводили с использованием сконструированных праймеров pBP-*rep*-F (5'-CGCAACAGGTA AAAAGCGGGA-3') и pBP-*rep*-R (5'-GACCTTCGCCACGCACACAT-3') производства ОДО «Праймтех» (Беларусь) при режимах: 95 °С – 3 мин (1 цикл); 95 °С – 30 с; 59 °С – 30 с; 72 °С – 30 с (35 циклов); 72 °С – 4 мин (1 цикл).

Аmplификацию *rep*-областей плазмид подобных pLS20 размером порядка 347 п. н. проводили с использованием сконструированных праймеров pLS20F (5'-CTGCCGTTAAGGGGTGTAA-3') и pLS20R (5'-AGACGTCTGAGGTTTCCAG-3') производства ОДО «Праймтех» (Беларусь) при режимах: 95 °С – 3 мин (1 цикл); 95 °С – 30 с; 47 °С – 30 с; 72 °С – 30 с (35 циклов); 72 °С – 4 мин (1 цикл).

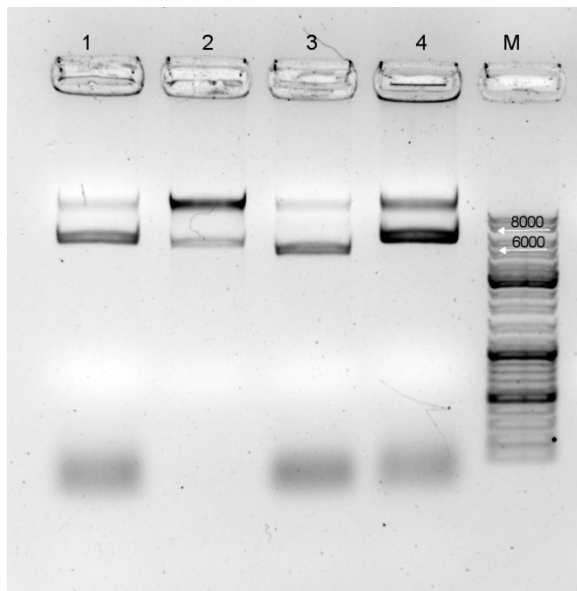


Рис. 1. Электрофореграмма плазмидной ДНК штаммов *B. pumilus*. Дорожки соответствуют штаммам: 1 – T2; 2 – БИМ В-171; 3 – 33-3; 4 – 63-2-2; М – GeneRuler™ DNA Ladder Mix

Fig. 1. Plasmids DNA electrophoregram of *B. pumilus*. Strains: 1 – T2; 2 – BIM В-171; 3 – 33-3; 4 – 63-2-2; М – GeneRuler™ DNA Ladder Mix

Полученные продукты визуализировали с помощью электрофореза в 0,8 %-ном агарозном геле с использованием системы цифровой документации видеоизображения ChemiDoc MP (BioRad, США). Размер фрагментов ДНК устанавливали на основании их электрофоретической подвижности в агарозном геле, в качестве референсной ДНК использовали маркеры ДНК GeneRuler 1 kb DNA Ladder и GeneRuler DNA Ladder Mix (ThermoScientific, Литва).

Результаты и их обсуждение. При изучении структурно-функциональной организации геномов бактерий *Bacillus pumilus*, изолированных из различных источников на территории Беларуси, нами установлено, что часть анализируемых штаммов содержат как минимум одну плазмиду [24]. При этом внехромосомные генетические элементы различались электрофоретической подвижностью в агарозном геле и имели размер не более 10 т. п. н. (рис. 1).

Известно, что плазмиды грамположительных бактерий такого размера копируются, как правило, в соответствии с механизмом «катыщегося кольца» (плазмиды RCR-типа) и относятся к одному из пяти семейств (pT181, pC194, pE194/pMV158, pSN2 и pJJ110/pJVJ). Внехромосомные генетические элементы одной классификационной группы характеризуются высокой степенью идентичности *rep*-областей и сходными механизмами наследования в клетке-хозяине [32].

Для установления классификационной принадлежности выявленных плазмид определяли сходство их нуклеотидных последовательностей с известными внехромосомными элементами бактерий рода *Bacillus*. Для этого в составе вектора pJET1.2 были клонированы HindII-фрагменты четырех различающихся по размеру плазмид, выделенных из штаммов *B. pumilus* T2, БИМ В-171, 33-3 и 63-2-2 (соответственно pBP-T2, pBP-B171, pBP-33-3, pBP-6322), и определены их нуклеотидные последовательности. Сиквенс-анализ встроенных участков ДНК позволил установить их сходство с плазмидами RCR-типа бактерий *B. pumilus*, *B. subtilis* и *B. safensis*. При этом самая высокая степень сходства (98 % идентичности) была выявлена для фрагмента размером 838 п. н. плазмиды pBP-B171 с целым рядом плазмид *B. pumilus* (pBp15.1S, pGR8, pPDSLzg-1, pC2-2, pPL7065) и плазмидой pPOD2000 бактерий *B. subtilis*. Нуклеотидные последовательности плазмид pBP-T2 и pBP-33-3 были сходны с теми же плазмидами, но в более низкой степени (идентичность составила от 84 до 95 %). Фрагмент размером 823 п. н. плазмиды pBP-6322 проявлял сходство с другими плазмидами бактерий *B. safensis* (pBA64) и *B. pumilus* (pBP6000 и pGLB197) (табл. 2).

Т а б л и ц а 2. Результаты сравнения последовательностей фрагментов плазмидной ДНК *B. pumilus* с нуклеотидными последовательностями базы данных ГенБанк

Table 2. The results of comparing the sequences of DNA fragments of *B. pumilus* plasmid with the nucleotide sequences of database GenBank

Фрагмент плазмидной ДНК, размер	Сходные последовательности в ГенБанке	Степень покрытия, %	Идентичность, %	Код доступа в ГенБанке
pBP-T2, 755 п. н.	pGR8, <i>B. pumilus</i>	100	93	CP009109.1
	pDW5-4, <i>B. zhangzhouensis</i>	85	93	MF503689.1
	pBp15.1S, <i>B. pumilus</i>	100	89	KM348008.1
	pPDSLzg-1, <i>B. pumilus</i>	100	84	CP016785.1
	pPL10, <i>B. pumilus</i>	99	84	AF036712.1
pBP-B171, 838 п. н.	pPOD2000, <i>B. subtilis</i>	85	84	U55043.1
	pBp15.1S, <i>B. pumilus</i>	100	98	KM348008.1
	pGR8, <i>B. pumilus</i>	100	98	CP009109.1
	pPDSLzg-1, <i>B. pumilus</i>	99	98	CP016785.1
	pC2-2, <i>B. pumilus</i>	99	98	MF503687.1
pBP-33-3, 840 п. н.	pPL7065, <i>B. pumilus</i>	99	97	AY230134.1
	pGR8, <i>B. pumilus</i>	100	94	CP009109.1
	pBp15.1S, <i>B. pumilus</i>	100	90	KM348008.1
	pDW5-4, <i>B. zhangzhouensis</i>	85	93	MF503689.1
	pPDSLzg-1, <i>B. pumilus</i>	100	85	CP016785.1
pBP-6322, 813 п. н.	pPL10, <i>B. pumilus</i>	98	84	AF036712.1
	pPZZ84, <i>B. pumilus</i>	76	87	GU144016.1
	pBA64, <i>B. safensis</i>	83	95	JX134061.1
	pBP6000, <i>B. pumilus</i>	83	79	KC683537.1
	pGLB197, <i>B. pumilus</i>	83	79	CP018575.1

П р и м е ч а н и е. Для фрагментов плазмидной ДНК pBP-T2, pBP-B171, pBP-33-3 представлен неполный список сходных последовательностей из ГенБанка.

В работе [10] по изучению плазмиды pBp15.1S, изолированной из этнопатогенного штамма *B. pumilus* 15.1, представлен детальный генетический анализ нуклеотидной последовательности ДНК. В результате гибридизации выявлены одноцепочечные интермедиаты, образующиеся в процессе копирования, что является характерной особенностью плазмид RCR-типа. Установлена идентичность сайтов *dso* (сайт инициации репликации ведущей нити ДНК), *ssso* (сайт инициации

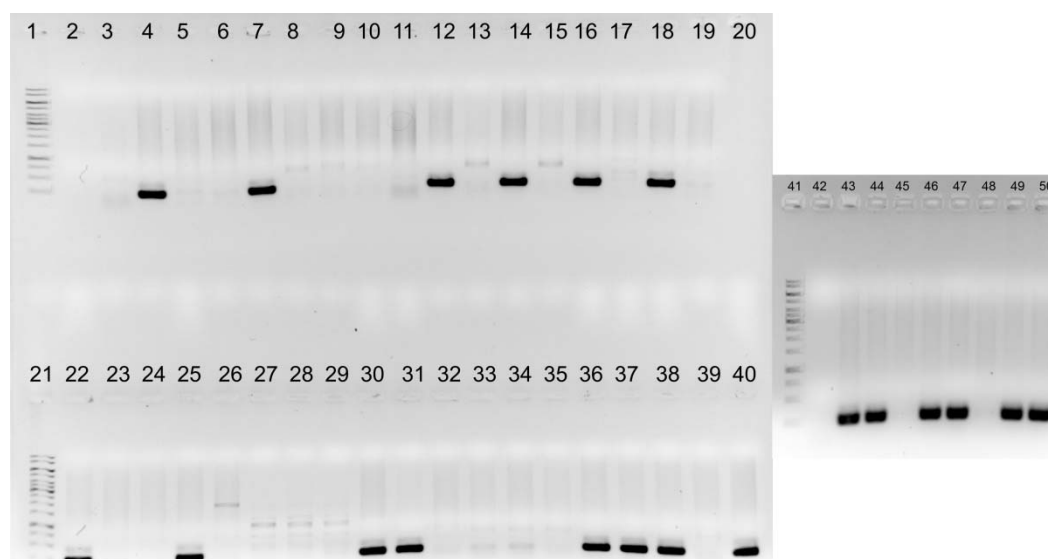


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов ПЦР, полученных с использованием праймеров pBP-*rep*-F и pBP-*rep*-R и ДНК бактерий рода *Bacillus*. Дорожки 1, 21, 41 соответствуют маркеру ДНК GeneRuler 1 kb DNA Ladder; 2, 20, 42 – отрицательный контроль (без ДНК матрицы); в качестве матрицы для ПЦР использована тотальная ДНК штаммов: 3 – *B. subtilis* 19 (отрицательный контроль); 17 – *B. safensis* U17-1 (отрицательный контроль); *B. pumilus*: 4 – 63-1-1; 5 – F6; 6 – 41.2; 7 – 44.2; 8 – 51.2; 9 – 61.2; 10 – 61.3; 11 – 36; 12 – 19.6; 13 – 32.8; 14 – 32.7; 15 – 33.5; 16 – 33.4; 18 – 33-3; 19 – 21-3; 22 – 1MRL; 23 – 17-2; 24 – T1; 25 – T2; 26 – P10; 27 – P107; 28 – P109; 29 – P110; 30 – 6-5-2; 31 – 71-4-1; 32 – 65-4; 33 – 38.2; 34 – 39.2; 35 – 39.3; 36 – 36.2; 37 – 37.7; 38 – 40.2; 39 – 11-1-1; 40, 43 – 63-2-2; 44 – БИМ В-394; 45 – БИМ В-369; 46 – БИМ В-171; 47 – БИМ В-373; 48 – БИМ В-211; 49 – 43-3-1; 50 – БИМ В-401

Fig. 2. Electrophoregram of PCR products received with the primers pBP-*rep*-F and pBP-*rep*-R and DNA of genus *Bacillus*. Strains: 1, 21, 41 – GeneRuler 1 kb DNA Ladder; 2, 20, 42 – negative control (no DNA matrix); DNA matrix is total bacterial DNA from strains: 3 – *B. subtilis* 19 (negative control); 17 – *B. safensis* U17-1 (negative control); *B. pumilus*: 4 – 63-1-1; 5 – F6; 6 – 41.2; 7 – 44.2; 8 – 51.2; 9 – 61.2; 10 – 61.3; 11 – 36; 12 – 19.6; 13 – 32.8; 14 – 32.7; 15 – 33.5; 16 – 33.4; 18 – 33-3; 19 – 21-3; 22 – 1MRL; 23 – 17-2; 24 – T1; 25 – T2; 26 – P10; 27 – P107; 28 – P109; 29 – P110; 30 – 6-5-2; 31 – 71-4-1; 32 – 65-4; 33 – 38.2; 34 – 39.2; 35 – 39.3; 36 – 36.2; 37 – 37.7; 38 – 40.2; 39 – 11-1-1; 40, 43 – 63-2-2; 44 – BIM В-394; 45 – BIM В-369; 46 – BIM В-171; 47 – BIM В-373; 48 – BIM В-211; 49 – 43-3-1; 50 – BIM В-401

репликации запаздывающей нити ДНК) и консервативных участков *rep*-гена с таковыми типовой плазмиды рТА1040 семейства рС194 [10]. Следовательно, плазмиды в клетках исследуемых бактерий могут принадлежать к этому же семейству.

Для подтверждения выдвинутого предположения были сконструированы праймеры (pBP-*rep*-F и pBP-*rep*-R), обеспечивающие амплификацию *rep*-областей плазмид семейства рС194. В качестве матрицы для проведения ПЦР использовали тотальную ДНК, выделенную из клеток 41 штамма природных бактерий *B. pumilus*. В качестве дополнительных отрицательных контролей использовали тотальную ДНК *B. subtilis* 19 и *B. safensis* U17-1, для которых определены нуклеотидные последовательности генома и подтверждено отсутствие плазмид семейства рС194. В результате ПЦР были получены ампликоны искомого размера при использовании в качестве матрицы тотальной ДНК, выделенной из клеток 19 штаммов (63-1-1, 44.2, 19.6, 32.7, 33.4, 33-3, 1MRL, T2, 6-5-2, 71-4-1, 36.2, 37.7, 40.2, 63-2-2, БИМ В-394, БИМ В-171, БИМ В-373, 43-3-1 и БИМ В-401) (рис. 2). Полученные данные свидетельствуют о широком распространении плазмид RCR-типа семейства рС194 в клетках природных бактерий *B. pumilus* (более 45 % штаммов содержат данные плазмиды).

Ранее на основании рестрикционного и сиквенс-анализа было показано, что плазмиды семейства рС194 характеризуются гетерогенностью и могут быть условно разделены на 7 подгрупп [33, 34]. Согласно размеру, количеству и расположению сайтов рестрикции, выделяют подгруппы рТА1015, рТА1020, рТА1030, рТА1040, рТА1050, рТА1060 (названия подгрупп соответствуют названию типовых плазмид бактерий *B. subtilis*) и подгруппу рFTV14, представленную плазмидой бактерий *B. amyloliquefaciens* S294 [35].

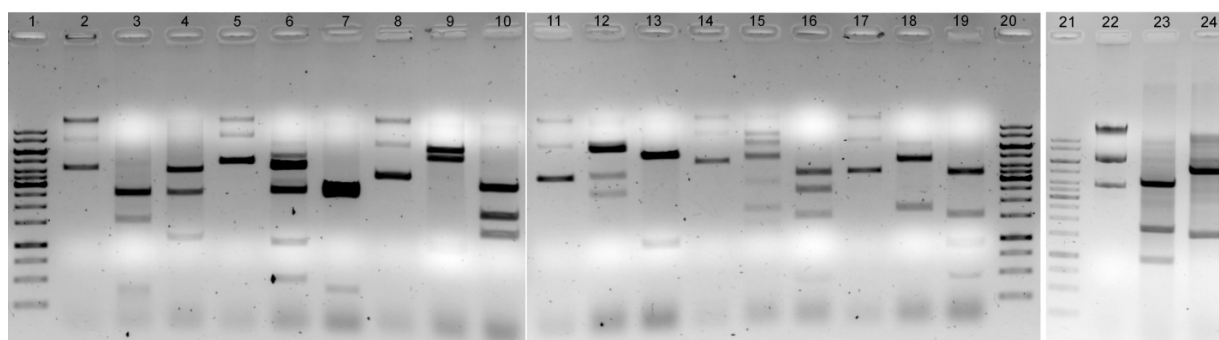


Рис. 3. Электрофореграмма фрагментов рестрикции плазмид природных бактерий *B. pumilus*. Дорожки 1, 20, 21 соответствуют маркеру молекулярного веса ДНК 1 kb DNA Ladder; 2, 5, 8, 11, 14, 17, 22 – соответственно исходные плазмиды pBP-33.4, pBP-6322, pBP-B394, pBP-1MRL, pBP-T2, pBP-33-3, pBP-B171; 3, 4, 6, 9, 12, 15, 18, 23 – соответственно плазмиды pBP-33.4, pBP-6322, pBP-B394, pBP-1MRL, pBP-T2, pBP-33-3, pBP-B171, порезанные HindIII; 4, 7, 10, 13, 16, 19, 24 – соответственно плазмиды pBP-33.4, pBP-6322, pBP-B394, pBP-1MRL, pBP-T2, pBP-33-3, pBP-B171, порезанные EcoRI

Fig. 3. Electrophoregram of restriction fragments of *B. pumilus* bacteria native plasmids. Strains: 1, 20, 21 – 1 kb DNA Ladder; 2, 5, 8, 11, 14, 17, 22 – plasmids pBP-33.4, pBP-6322, pBP-B394, pBP-1MRL, pBP-T2, pBP-33-3, pBP-B171, respectively; 3, 4, 6, 9, 12, 15, 18, 23 – plasmids cut with HindIII pBP-33.4, pBP-6322, pBP-B394, pBP-1MRL, pBP-T2, pBP-33-3, pBP-B171, respectively; 4, 7, 10, 13, 16, 19, 24 – plasmids cut with EcoRI pBP-33.4, pBP-6322, pBP-B394, pBP-1MRL, pBP-T2, pBP-33-3, pBP-B171, respectively

На основании сходства рестрикционных профилей (использовали рестриктазы HindIII и EcoRI) все исследованные плазмиды природных бактерий *B. pumilus* также были разделены на 7 подгрупп (рис. 3, табл. 3). При этом наиболее распространенный тип плазмид (11 из 19) по размеру и расположению сайтов рестрикции для ферментов HindIII и EcoRI полностью соответствовал плазмиде pBp15.1S бактерий *B. pumilus* 15.1 [10]. Других совпадений с известными плазмидами не выявлено.

Таблица 3. Результаты рестрикционного анализа плазмид природных бактерий *B. pumilus*

Table 3. Results of restriction analysis of *B. pumilus* bacteria native plasmids

Плазмиды	Размер плазмиды, п. н.	Рестриктаза	К-во сайтов рестрикции	Размер фрагментов рестрикции, п. н.
pBP-19.6, pBP-32.7, pBP-33.4, pBP-36.2, pBP-37.7, pBP-40.2, pBP-44.2, pBP-4331, pBP-6313, pBP-652, pBP-7414	7700	HindIII	5 (6)	2600, 2500, 1600, 400, 350 (250)
		EcoRI	3	4000, 2600, 1100
pBP-6322	8500	HindIII	4	4300, 2700, 1000, 500
		EcoRI	4 (5)	2800, 2700, 2500, 400 (100)
pBP-B394	6500	HindIII	2	5500, 1000
		EcoRI	3	3200, 1900, 1400
pBP-1MRL	6200	HindIII	2	3600, 2600
		EcoRI	2	5200, 1000
pBP-T2	7950	HindIII	4	4800, 1800, 1100, 250
		EcoRI	4	3500, 2500, 1500, 450
pBP-33-3	6400	HindIII	2	4600, 1800
		EcoRI	4	3500, 1500, 900, 490
pBP-B171, pBP-B373, pBP-B401	7100	HindIII	3	4300, 1800, 1000
		EcoRI	2	5500, 1600

Примечание. Размер фрагментов рассчитывали на основании электрофоретической подвижности в сравнении с фрагментами маркера молекулярного веса; размер плазмид определяли путем сложения длин фрагментов.

Полученные данные позволяют заключить, что все исследованные плазмиды природных бактерий *B. pumilus*, циркулирующих на территории Беларуси, относятся к одному семейству, но при этом характеризуются генетическим полиморфизмом.

Помимо плазмид небольшого размера (до 10 т. п. н.) для бактерий *B. pumilus* характерно присутствие крупных плазмид. В частности, в клетках бактерий *B. pumilus* NRS576 содержится

плазмида p576 размером 43,3 т. п. н., функциональный анализ которой позволил выявить последовательность (1000 п. н.), необходимую для ее копирования. Для охарактеризованной *rep*-области выявлено сходство с аналогичной последовательностью плазмиды pLS20 бактерий *B. subtilis* [9]. В пределах данной области на наиболее идентичных участках нуклеотидных последовательностей p576 и pLS20 была подобрана пара праймеров pLS20F/R, фланкирующих фрагмент размером 347 п. н. Проведенный ПЦР-анализ с использованием в качестве матрицы тотальной ДНК, выделенной из клеток 41 природного штамма *B. pumilus*, не позволил выявить ампликоны искомого размера (целевой продукт ПЦР был обнаружен только с матрицей, выделенной из штамма *B. subtilis*, содержащего плазмиду pLS20, данные не представлены). Полученный результат позволяет с высокой достоверностью утверждать, что плазмиды, подобные pLS20, не содержатся в клетках исследованных бактерий.

Заключение. Таким образом, в клетках природных бактерий *B. pumilus*, циркулирующих на территории Беларуси, довольно широко распространены плазмиды RCR-типа семейства pC194. Все исследованные плазмиды природных бактерий *B. pumilus* являются филогенетически родственными, но при этом характеризуются генетической гетерогенностью. Наиболее часто встречаются внехромосомные генетические элементы размером 7,7 т. п. н., идентичные плазмиде pBp15.1S из энтомопатогенного штамма *B. pumilus* 15.1. Плазмиды с тета-типом репликации, подобные pLS20, не содержатся в клетках исследованных бактерий.

Благодарности. Исследование выполнено при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (Б19-110).

Авторы выражают благодарность профессору М. А. Титок, доценту В. Е. Мямину, ассистентам биологического факультета БГУ Е. И. Комар (кафедра микробиологии) и Ю. Н. Горовику (кафедра молекулярной биологии), а также старшему научному сотруднику В. Н. Акимову (ИБФМ РАН, Пушкино) за предоставленные штаммы бактерий.

Acknowledgements. The study was carried out with the financial support of the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (B19-110).

The authors are grateful to Professor M. A. Titok, Assistant Professor V. Ye. Miamin, Assistants of the Biological Faculty of the BSU E. E. Komar (Department of Microbiology) and Yu. N. Gorovik (Department of Molecular Biology), as well as Senior researcher V. N. Akimov (IBPM RAS, Pushchino) for providing bacterial strains.

Список использованных источников

1. Asha Poorna, C. Production of cellulase-free endoxylanase from novel alkalophilic thermotolerant *Bacillus pumilus* by solid-state fermentation and its application in wastepaper recycling / C. Asha Poorna, P. Prema // *Biores. Technol.* – 2007. – Vol. 98, N 3. – P. 485–490. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.02.033>
2. Kaushal, M. *Bacillus pumilus* strain YSPMK11 as plant growth promoter and biocontrol agent against *Sclerotinia sclerotiorum* / M. Kaushal, A. Kumar, R. Kaushal // *3 Biotech.* – 2017. – Vol. 7, N 2. – Art. 90. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0732-7>
3. *Bacillus pumilus* ES4: candidate plant growth-promoting bacterium to enhance establishment of plants in mine tailings / L. E. de-Bashan [et al.] // *Environ. Exp. Bot.* – 2010. – Vol. 69, N 3. – P. 343–352. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2010.04.014>
4. Characterization of *Bacillus* probiotics available for human use / L. H. Duc [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2004. – Vol. 70, N 4. – P. 2161–2171. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.4.2161-2171.2004>
5. Galal, A. A. *Bacillus pumilus*, a new pathogen on Mango plants / A. A. Galal, A. A. El-Bana, J. Janse // *Egypt J. Phytopathol.* – 2006. – Vol. 34, N 1. – P. 17–19.
6. Bentur, H. Central venous catheter infection with *Bacillus pumilus* in an immunocompetent child: a case report / H. N. Bentur, A. M. Dalzell, F. A. Riordan // *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* – 2007. – Vol. 6. – Art. 12. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-6-12>
7. First report of *Bacillus pumilus* on *Phaseolus vulgaris* in Spain / M. I. Font [et al.] // *Plant Pathol.* – 2010. – Vol. 59, N 2. – P. 400. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02172.x>
8. Two cases of severe sepsis caused by *Bacillus pumilus* in neonatal infants / M. Kimouli [et al.] // *J. Med. Microbiol.* – 2012. – Vol. 61, N 4. – P. 596–599. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.033175-0>
9. Complete nucleotide sequence and determination of the replication region of the sporulation inhibiting plasmid p576 from *Bacillus pumilus* NRS576 / P. K. Singh [et al.] // *Res. Microbiol.* – 2010. – Vol. 161, N 9. – P. 772–782. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2010.07.007>
10. Identification, sequencing and comparative analysis of pBp15.S plasmid from the newly described entomopathogen *Bacillus pumilus* 15.1 / D. C. Garcia-Ramon [et al.] // *Plasmid.* – 2015. – Vol. 82. – P. 17–27. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2015.09.001>
11. Lovett, P. S. Cryptic plasmid in *Bacillus pumilus* ATCC 7065 / P. S. Lovett, B. D. Burdick // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1973. – Vol. 54, N 1. – P. 365–370. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(73\)90931-5](https://doi.org/10.1016/0006-291x(73)90931-5)

12. Host function specified by *Bacillus pumilus* plasmid pPL7065 / P. S. Lovett [et al.] // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 1977. – Vol. 12, N 3. – P. 435–437. <https://doi.org/10.1128/aac.12.3.435>
13. Lovett, P. S. Plasmid deoxyribonucleic acid in *Bacillus subtilis* and *Bacillus pumilus* / P. S. Lovett, M. G. Bramucci // *J. Bacteriol.* – 1975. – Vol. 124, N 1. – P. 484–490.
14. Lovett, P. S. *Bacillus pumilus* plasmid pPL10: properties and insertion into *Bacillus subtilis* 168 by transformation / P. S. Lovett, E. J. Duvall, K. M. Keggin // *J. Bacteriol.* – 1976. – Vol. 127, N 2. – P. 817–828.
15. Hasnain, S. Two related rolling circle replication plasmids from salt-tolerant bacteria / S. Hasnain, C. M. Thomas // *Plasmid.* – 1996. – Vol. 36, N 3. – P. 191–199. <https://doi.org/10.1006/plas.1996.0046>
16. Characterization of a cryptic plasmid pPZZ84 from *Bacillus pumilus* / Z.-H. Zhang [et al.] // *Plasmid.* – 2010. – Vol. 64, N 3. – P. 200–203. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2010.06.006>
17. Yuan, Y. Genomic analysis of a ginger pathogen *Bacillus pumilus* providing the understanding to the pathogenesis and the novel control strategy / Y. Yuan, M. Gao // *Sci. Rep.* – 2015. – Vol. 5. – Art. 10259. <https://doi.org/10.1038/srep10259>
18. Complete genome sequence of *Bacillus pumilus* PDSLzg-1, a hydrocarbon-degrading bacterium isolated from oil-contaminated soil in China / K. Hao [et al.] // *Genome Announc.* – 2016. – Vol. 4, N 5. – Pii e01079–16. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01079-16>
19. Draft genome sequence of *Bacillus pumilus* strain GM3FR, an endophyte isolated from aerial plant tissues of *Festuca rubra* L. / J. Hollensteiner [et al.] // *Genome Announc.* – 2017. – Vol. 5, N 13. – Pii e00085–17. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00085-17>
20. Lovett, P. S. Plasmid in *Bacillus pumilus* and the enhanced sporulation of plasmid-negative variants / P. S. Lovett // *J. Bacteriol.* – 1973. – Vol. 115, N 1. – P. 291–298.
21. Lovett, P. S. Evidence for a nonrandom base sequence in a *Bacillus pumilus* plasmid: EcoRI endonuclease digestion of pPL576 / P. S. Lovett, M. G. Bramucci // *J. Bacteriol.* – 1975. – Vol. 123, N 1. – P. 377–379.
22. Use of a plasmid DNA probe to monitor populations of *Bacillus pumilus* inoculant strains in hay / C. A. Hendrick [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1991. – Vol. 57, N 3. – P. 686–693.
23. Insertion of Tn916 into *Bacillus pumilus* plasmid pMGD302 and evidence for plasmid transfer by conjugation / C. A. Hendrick [et al.] // *Plasmid.* – 1991. – Vol. 26, N 1. – P. 1–9. [https://doi.org/10.1016/0147-619x\(91\)90031-q](https://doi.org/10.1016/0147-619x(91)90031-q)
24. Евдокимова, О. В. Биохимическая и молекулярно-генетическая характеристика бактерий *Bacillus pumilus*, изолированных на территории Беларуси / О. В. Евдокимова, В. Е. Мямин, Л. Н. Валентович // *Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология.* – 2018. – № 1. – С. 38–49.
25. Евдокимова, О. В. Идентификация бактерий *Bacillus pumilus* с помощью видоспецифичной ПЦП / О. В. Евдокимова, В. Е. Мямин, Л. Н. Валентович // *Молекулярная и прикладная генетика : сб. науч. тр. / Ин-т генетики и цитологии НАН Беларуси ; редкол. : А. В. Кильчевский (гл. ред.) [и др.]*. – Минск, 2016. – Т. 21. – С. 53–63.
26. Anagnostopoulos, C. Requirements for transformation in *Bacillus subtilis* / C. Anagnostopoulos, J. Spizizen // *J. Bacteriol.* – 1961. – Vol. 81, N 5. – P. 741–746.
27. Крупная плазида из почвенного штамма *Bacillus subtilis*, осуществляющая конъюгативную мобилизацию с высокой частотой / О. В. Лотарева [и др.] // *Докл. Акад. наук.* – 2001. – Т. 379, № 1. – С. 130–131.
28. Tanaka, T. Isolation and characterization of four types of plasmids from *Bacillus subtilis* (natto) / T. Tanaka, T. Koshikawa // *J. Bacteriol.* – 1977. – Vol. 131, N 2. – P. 699–701.
29. Bullock, W. O. XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA E. coli* strain with beta-galactosidase selection / W. O. Bullock, J. M. Fernandez, J. M. Short // *BioTechniques.* – 1987. – Vol. 5, N 3. – P. 376–379.
30. Voskuil, M. I. Rapid isolation and sequencing of purified plasmid DNA from *Bacillus subtilis* / M. I. Voskuil, G. H. Chambliss // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1993. – Vol. 59, N 4. – P. 1138–1142.
31. Sanger, F. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors / F. Sanger, S. Nicklen, A. R. Coulson // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1977. – Vol. 74, N 12. – P. 5463–5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
32. Титок, М. А. Плазмиды грамположительных бактерий / М. А. Титок. – Минск : Изд-во БГУ, 2004. – 120 с.
33. Rolling-circle plasmids from *Bacillus subtilis*: complete nucleotide sequences and analyses of genes of pTA1015, pTA1040, pTA1050 and pTA1060, and comparisons with related plasmids from gram-positive bacteria / W. J. Meijer [et al.] // *FEMS Microbiol. Rev.* – 1998. – Vol. 21, N 4. – P. 337–368. [https://doi.org/10.1016/s0168-6445\(98\)00003-5](https://doi.org/10.1016/s0168-6445(98)00003-5)
34. New cryptic plasmid of *Bacillus subtilis* and restriction analysis of other plasmids found by general screening / T. Uozumi [et al.] // *J. Bacteriol.* – 1980. – Vol. 142, N 1. – P. 315–318.
35. Distribution of heterogeneous and homologous plasmids in *Bacillus* spp. / K. Yoshimura [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1983. – Vol. 45, N 6. – P. 1733–1740.

References

1. Asha Poorna C., Prema P. Production of cellulase-free endoxylanase from novel alkalophilic thermotolerant *Bacillus pumilus* by solid-state fermentation and its application in wastepaper recycling. *Bioresource Technology*, 2006, vol. 98, no. 3, pp. 485–490. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.02.033>
2. Kaushal M., Kumar A., Kaushal R. *Bacillus pumilus* strain YSPMK11 as plant growth promoter and biocontrol agent against *Sclerotinia sclerotiorum*. *3 Biotech*, 2017, vol. 7, no. 2, art. 90. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0732-7>
3. De-Bashan L. E., Hernandez J.-P., Bashan Y., Maier R. *Bacillus pumilus* ES4: candidate plant growth-promoting bacterium to enhance establishment of plants in mine tailings. *Environmental and Experimental Botany*, 2010, vol. 69, no. 3, pp. 343–352. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2010.04.014>

4. Duc L. H., Hong H. A., Barbosa T. M., Henriques A. O., Cutting S. M. Characterization of *Bacillus* probiotics available for human use. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, vol. 70, no. 4, pp. 2161–2171. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.4.2161-2171.2004>
5. Galal A. A., El-Bana A. A., Janse J. *Bacillus pumilus*, a new pathogen on Mango plants. *Egyptian Journal of Phytopathology*, 2006, vol. 34, no. 1, pp. 17–19.
6. Bentur H. N., Dalzell A. M., Riordan F. A. Central venous catheter infection with *Bacillus pumilus* in an immunocompetent child: a case report. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 2007, vol. 6, art. 12. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-6-12>
7. Font M. I., Bassimba D. M., Cebrián M. C., Molina L. M., Jordá C. First report of *Bacillus pumilus* on *Phaseolus vulgaris* in Spain. *Plant Pathology*, 2010, vol. 59, no. 2, pp. 400. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02172.x>
8. Kimouli M., Vrioni G., Papadopoulou M., Koumaki V., Petropoulou D., Gounaris A., Friedrich A. W., Tsakris A. Two cases of severe sepsis caused by *Bacillus pumilus* in neonatal infants. *Journal of Medical Microbiology*, 2012, vol. 61, no. 4, pp. 596–599. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.033175-0>
9. Singh P. K., Ballesterro-Beltrán S., Ramachandran M., Meijer W. J. J. Complete nucleotide sequence and determination of the replication region of the sporulation inhibiting plasmid p576 from *Bacillus pumilus* NRS576. *Research in Microbiology*, 2010, vol. 161, no. 9, pp. 772–782. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2010.07.007>
10. Garcia-Ramon D. C., Luque-Navas M. J., Luque-Navas C. A., del Val C., Osuna A., Vilchez S. Identification, sequencing and comparative analysis of pBp15.S plasmid from the newly described entomopathogen *Bacillus pumilus* 15.1. *Plasmid*, 2015, vol. 82, pp. 17–27. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2015.09.001>
11. Lovett P. S., Burdick B. D. Cryptic plasmid in *Bacillus pumilus* ATCC 7065. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1973, vol. 54, no. 1, pp. 365–370. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(73\)90931-5](https://doi.org/10.1016/0006-291x(73)90931-5)
12. Lovett P. S., Duvall E. J., Bramucci M. G., Taylor R. Host function specified by *Bacillus pumilus* plasmid pPL7065. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1977, vol. 12, no. 3, pp. 435–437. <https://doi.org/10.1128/aac.12.3.435>
13. Lovett P. S., Bramucci M. G. Plasmid deoxyribonucleic acid in *Bacillus subtilis* and *Bacillus pumilus*. *Journal of Bacteriology*, 1975, vol. 124, no. 1, pp. 484–490.
14. Lovett P. S., Duvall E. J., Keggins K. M. *Bacillus pumilus* plasmid pPL10: properties and insertion into *Bacillus subtilis* 168 by transformation. *Journal of Bacteriology*, 1976, vol. 127, no. 2, pp. 817–828.
15. Hasnain S., Thomas C. M. Two related rolling circle replication plasmids from salt-tolerant bacteria. *Plasmid*, 1996, vol. 36, no. 3, pp. 191–199. <https://doi.org/10.1006/plas.1996.0046>
16. Zhang Z.-H., Tian W., Liu D.-Y., Liu Y.-C., Shen Q.-R., Shen B. Characterization of a cryptic plasmid pPZZ84 from *Bacillus pumilus*. *Plasmid*, 2010, vol. 64, no. 3, pp. 200–203. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2010.06.006>
17. Yuan Y., Gao M. Genomic analysis of a ginger pathogen *Bacillus pumilus* providing the understanding to the pathogenesis and the novel control strategy. *Scientific Reports*, 2015, vol. 5, art. 10259. <https://doi.org/10.1038/srep10259>
18. Hao K., Li H., Li F., Guo P. Complete genome sequence of *Bacillus pumilus* PDSLzg-1, a hydrocarbon-degrading bacterium isolated from oil-contaminated soil in China. *Genome Announcements*, 2016, vol. 4, no. 5, pii e01079–16. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01079-16>
19. Hollensteiner J., Poehlein A., Daniel R., Liesegang H., Vidal S., Wemheuer F. Draft genome sequence of *Bacillus pumilus* strain GM3FR, an endophyte isolated from aerial plant tissues of *Festuca rubra* L. *Genome Announcements*, 2017, vol. 5, no. 13, pii e00085–17. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00085-17>
20. Lovett P. S. Plasmid in *Bacillus pumilus* and the enhanced sporulation of plasmid-negative variants. *Journal of Bacteriology*, 1973, vol. 115, no. 1, pp. 291–298.
21. Lovett P. S., Bramucci M. G. Evidence for a nonrandom base sequence in a *Bacillus pumilus* plasmid: EcoRI endonuclease digestion of pPL576. *Journal of Bacteriology*, 1975, vol. 123, no. 1, pp. 377–379.
22. Hendrick C. A., Smiley B. K., Shelley T. H., Tomes N. J. Use of a plasmid DNA probe to monitor populations of *Bacillus pumilus* inoculant strains in hay. *Applied and Environmental Microbiology*, 1991, vol. 57, no. 3, pp. 686–693.
23. Hendrick C. A., Johnson L. K., Tomes N. J., Smiley B. K., Price J. P. Insertion of Tn916 into *Bacillus pumilus* plasmid pMGD302 and evidence for plasmid transfer by conjugation. *Plasmid*, 1991, vol. 26, no. 1, pp. 1–9. [https://doi.org/10.1016/0147-619x\(91\)90031-q](https://doi.org/10.1016/0147-619x(91)90031-q)
24. Evdokimova O. V., Myamin V. E., Valentovich L. N. Biochemical and molecular genetic characteristics of *Bacillus pumilus* bacteria isolated in Belarus. *Zhurnal Belorusskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya* [Journal of Belarusian State University. Biology], 2018, no. 1, p. 38–49 (in Russian).
25. Evdokimova O. V., Myamin V. E., Valentovich L. N. Identification of *Bacillus pumilus* bacteria by using species-specific PCR assay. *Molekulyarnaya i prikladnaya genetika: sbornik nauchnykh trudov* [Molecular and applied genetics: a collection of scientific papers]. Minsk, 2016, vol. 21, pp. 53–63 (in Russian).
26. Anagnostopoulos C., Spizizen J. Requirements for transformation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 1961, vol. 81, no. 5, pp. 741–746.
27. Lotareva O. V., Poluektova E. U., Titok M. A., Prozorov A. A. Large plasmid from soil strain *Bacillus subtilis*, performing conjugative mobilization with high frequency. *Doklady Biological Sciences*, 2001, vol. 379, no. 1–6, pp. 334–335. <https://doi.org/10.1023/A:1011696012313>
28. Tanaka T., Koshikawa T. Isolation and characterization of four types of plasmids from *Bacillus subtilis* (natto). *Journal of Bacteriology*, 1977, vol. 131, no. 2, pp. 699–701.
29. Bullock W. O., Fernandez J. M., Short J. M. XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming recA *E. coli* strain with beta-galactosidase selection. *BioTechniques*, 1987, vol. 5, no. 3, pp. 376–379.

30. Voskuil M. I., Chambliss G. H. Rapid isolation and sequencing of purified plasmid DNA from *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, vol. 59, no. 4, pp. 1138–1142.
31. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1977, vol. 74, no. 12, pp. 5463–5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
32. Titok M. A. *Plasmids of gram-positive bacteria*. Minsk, Publishing House of the Belarusian State University, 2004. 130 p. (in Russian).
33. Meijer W. J., Wisman G. B., Terpstra P., Thorsted P. B., Thomas C. M., Holsappel S., Venema G., Bron S. Rolling-circle plasmids from *Bacillus subtilis*: complete nucleotide sequences and analyses of genes of pTA1015, pTA1040, pTA1050 and pTA1060, and comparisons with related plasmids from gram-positive bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 1998, vol. 21, no. 4, pp. 337–368. [https://doi.org/10.1016/s0168-6445\(98\)00003-5](https://doi.org/10.1016/s0168-6445(98)00003-5)
34. Uozumi T., Ozaki A., Beppu T., Arima K. New cryptic plasmid of *Bacillus subtilis* and restriction analysis of other plasmids found by general screening. *Journal of Bacteriology*, 1980, vol. 142, no. 1, pp. 315–318.
35. Yoshimura K., Yamamoto O., Seki T., Oshima Y. Distribution of heterogeneous and homologous plasmids in *Bacillus* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 1983, vol. 45, no. 6, pp. 1733–1740.

Информация об авторах

Евдокимова Олеся Владимировна – науч. сотрудник. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: evdokimovalesia@gmail.com

Чиндарева Мария Александровна – студентка. Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: maryja.che@gmail.com

Валентович Леонид Николаевич – канд. биол. наук, доцент, заведующий лабораторией. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь), Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: valentovich@mbio.bas-net.by

Information about the authors

Olesia V. Evdokimova – Researcher. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: evdokimovalesia@gmail.com

Maryja A. Chindareva – Student. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: maryja.che@gmail.com

Leonid N. Valentovich – Ph. D. (Biol.), Assistant Professor, Head of the Laboratory. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus), Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: valentovich@mbio.bas-net.by