

ISSN 1029-8940 (Print)
ISSN 2524-230X (Online)
УДК 575:579.852.11
<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-2-219-228>

Поступила в редакцию 10.11.2021
Received 10.11.2021

А. С. Гуринович, Н. Е. Сацункевич, М. А. Титок

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

РАСПРОСТРАНЕНИЕ pBS72-ПОДОБНЫХ КОНЪЮГАТИВНЫХ ПЛАЗМИД СРЕДИ ПРИРОДНЫХ БАКТЕРИЙ РОДА *BACILLUS*

Аннотация. В результате проведенного исследования в изолированных из разных природных источников на территории Беларуси почвенных образцах, содержащих бактерии *B. subtilis*, с частотой 27 % (в 22 образцах из 36 исследованных) выявлены pBS72-подобные репликоны. На основе 99–100 %-ного сходства белков, ответственных за репликацию (Rep-белки) и конъюгацию (белки VirB4, VirB6, VirB11, VirD4, Mob), установлено, что pBS72-подобные конъюгативные плазмиды присутствуют в клетках природных бактерий *B. subtilis*, циркулирующих на территории Пакистана, Китая и Нидерландов, а также в клетках бактерий *B. rugosus*, изолированных на территории Индии. Сходные репликоны (Rep-белки идентичны на 62 %), способные передаваться путем конъюгации (ключевые белки конъюгации идентичны на 60–80 %), обнаружены в бактериях *Bacillus sp.*, *B. licheniformis*, *B. paralicheniformis* и *B. subtilis*, выделенных в США, Австралии, Китае и Южной Корее.

Ключевые слова: бактерии рода *Bacillus*, плазмидные репликоны, система конъюгационного переноса

Для цитирования: Гуринович, А. С. Распространение pBS72-подобных конъюгативных плазмид среди природных бактерий рода *Bacillus* / А. С. Гуринович, Н. Е. Сацункевич, М. А. Титок // Вест. Нац. акад. Навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2022. – Т. 67, № 2. – С. 219–228. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-2-219-228>

Anastasiya S. Hurynovich, Natallia E. Satsunkevich, Marina A. Titok

Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

DISTRIBUTION OF pBS72-LIKE CONJUGATIVE PLASMIDS AMONG NATURAL BACTERIA OF THE GENUS *BACILLUS*

Abstract. As a result of the research pBS72-like replicons were detected with a frequency of 27 % in soil samples isolated from various natural sources on the territory of Belarus, which contained bacteria *B. subtilis* (were detected in 22 samples out of 36 studied). It was established that pBS72-like conjugative plasmids are present in the cells of natural bacteria *B. subtilis* circulating in Pakistan, China, and the Netherlands, and are also found in bacteria *B. rugosus* isolated in India. The homology of proteins responsible for replication (Rep-proteins) and conjugation (VirB4, VirB6, VirB11, VirD4, Mob proteins) was 99–100 %. Similar replicons (Rep proteins are 62 % identical) capable of being transmitted by conjugation (key conjugation proteins are 60–80 % identical) were found in the bacteria *Bacillus sp.*, *B. licheniformis*, *B. paralicheniformis* and *B. subtilis*, allocated in the USA, Australia, China and South Korea.

Keywords: bacteria of the genus *Bacillus*, plasmid replicons, conjugation transfer system

For citation: Hurynovich A. S., Satsunkevich N. E., Titok M. A. Distribution of pBS72-like conjugative plasmids among natural bacteria of the genus *Bacillus*. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2022, vol. 67, no. 2, pp. 219–228 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-2-219-228>

Введение. Повсеместно распространенные бактерии рода *Bacillus*, способные утилизировать широкий спектр органических и неорганических субстратов, а также синтезировать широкий спектр биологически активных соединений, используются в биотехнологии в качестве продуцентов чужеродных белков, ферментов, антимикробных соединений, стимуляторов роста растений, пробиотиков [1, 2]. Для практического использования микроорганизмов необходимо комплексное изучение их генома, в том числе и внехромосомных генетических элементов, являющихся частью генетического аппарата и определяющих важнейшие этапы жизнедеятельности бактериальной клетки. Особый интерес представляют плазмиды природных бактерий *B. subtilis*, поскольку данные микроорганизмы признаны безопасными для человека и животных (имеют статус GRAS) и их использование в биотехнологических производствах практически не имеет

ограничений. В клетках бактерий *B. subtilis*, как правило, выявляются внехромосомные генетические элементы небольшого размера (до 10 kb) семейства pC194, содержащие гены общего метаболизма, некоторые из которых способны мобилизоваться на перенос путем конъюгации (например, *pTA1015*, *pTA1060*, *p1414*) [3]. В клетках природных бактерий *B. subtilis* выявлено только две конъюгативные плазмиды – pLS20 и pBS72, которые имеют разные системы инициации репликации и способны передаваться с высокой частотой в изогенных системах скрещиваний, а также мобилизовать перенос в клетки гетерологичных бактерий рода *Bacillus* неконъюгативные внехромосомные генетические элементы разных таксономических групп, содержащих *mobV*-сайт [4, 5]. Интерес к данным внехромосомным генетическим элементам обусловлен прежде всего их способностью обеспечивать горизонтальный перенос генов среди бактерий природных популяций. В связи с этим присутствие конъюгативных плазмид-подобных pBS72 необходимо учитывать при использовании природных бактерий *B. subtilis* в качестве основы биопрепаратов для практического использования (например, в качестве стимуляторов роста растений, пробиотиков для животных).

Целью настоящей работы являлось изучение распространения среди природных бактерий рода *Bacillus* pBS72-подобных конъюгативных плазмид.

Материалы и методы исследования. В работе использовали 36 почвенных образцов, отобранных из различных природных источников на территории Беларуси. Почвенные образцы в количестве 1 г каждый культивировали в полноценной среде LB [6] при температуре 37 °C в течение 24 ч с последующим выделением тотальной ДНК с помощью саркозиевого метода [7].

Для амплификации использовали Taq-ДНК-полимеразу производства ThermoScientific (ЕС) и праймеры производства ОДО «Праймтех» (Беларусь). Реакционная смесь (20 мкл) для полимеразной цепной реакции (ПЦР) содержала около 100 нг ДНК-матрицы, 0,2 ммоль/л каждого дНТФ, 0,3 мкмоль/л каждого праймера, 1,25 ед. ДНК-полимеразы и соответствующий буфер.

Для амплификации фрагментов генов бактериальных 16S рРНК размером 1484 п. н. использовали праймеры 8f (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') и 1492r (5'-TAC GGH TAC CTT GTT ACG ACT T-3') при режиме амплификации: 94 °C – 5 мин (1 цикл); 94 °C – 30 с, 52 °C – 30 с, 72 °C – 1,5 мин (30 циклов); 72 °C – 10 мин (1 цикл).

Для амплификации фрагментов генов *spoA* бактерий *B. subtilis* размером 481 п. н. использовали праймеры F10A (5'-AAA ACT GCA GCA TGT AGC AAG GGT GAA TCC-3') и R10A (5'-CGC GGA TCC CTG CTG CGT ATA ATC TGC-3') при режиме амплификации: 94 °C – 3 мин (1 цикл); 94 °C – 30 с, 50 °C – 30 с, 72 °C – 30 с (30 циклов); 72 °C – 5 мин (1 цикл).

Для амплификации *rep*-области плазмиды pBS72 размером 1920 п. н. использовали праймеры Rep72F (5'-GCC CTT AAG CAT TGA CTT TAG CGA CCC-3') и Rep72R (5'-GCC CTT AAG AGA CTC САА АСГ АГТ СТГ-3') при режиме амплификации: 94 °C – 5 мин (1 цикл); 94 °C – 30 с, 50 °C – 30 с, 68 °C – 4 мин 30 с (30 циклов); 72 °C – 5 мин (1 цикл).

Для амплификации фрагмента генома плазмиды pBS72 размером 685 п. н. (локус между *orf138* и *orf139*) использовали праймеры F2 (5'-TAA ATC GCT TCC CTC CTT C-3') и R2 (5'-GTT TCC ACT GTC CAG GAG-3') при режиме амплификации: 94 °C – 3 мин (1 цикл); 94 °C – 30 с, 50 °C – 30 с, 72 °C – 42 с (5 циклов); 94 °C – 30 с, 53 °C – 30 с, 72 °C – 42 с (20 циклов); 72 °C – 5 мин (1 цикл).

Электрофоретический анализ ДНК осуществляли общепринятыми методами, приведенными в руководстве [8]. Размер фрагментов ДНК устанавливали на основании их электрофоретической подвижности в агарозном геле, в качестве реперной ДНК использовали GeneRuler™ DNA LadderMix производства ThermoScientific (ЕС).

Поиск и сравнительный анализ плазмид-подобных pBS72 (регистрационный номер в GenBank NCBI – KX711616) осуществляли на основании сходства систем инициации репликации (Rep-белок) и ключевых белков конъюгационного переноса VirB4, VirB6, VirB11, VirD4 и Mob, используя программы BLASTN2.10.0 (сайт: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) и Mauve [9].

Результаты и их обсуждение. Ранее с помощью методов рестрикционного анализа и гибридизации плазмидной ДНК было установлено, что 20 % спорообразующих бактерий, выделенных из различных природных источников на территории Беларуси, содержали идентичные плазмиды

размером около 100 kb (обнаружены в 11 штаммах из 55 проверенных) [10, 11]. Для одной из выявленных плазмид (р19) была определена нуклеотидная последовательность области, ответственной за репликацию (регистрационный номер в GenBank NCBI – EF506610) и конъюгацию (регистрационный номер в GenBank NCBI – FJ434456), а для плазмиды рBS72 – полная нуклеотидная последовательность генома (регистрационный номер в GenBank NCBI – KX711616). Сравнительный анализ секвенированных последовательностей позволил установить их полную идентичность. На основании чувствительности к специфическим фагам, а также рекомбинационного анализа все отобранные плазмидсодержащие бактерии были отнесены к виду *B. subtilis* [10]. Отличительной особенностью выявленных плазмидных репликонов являлась их способность передаваться путем конъюгации в жидкой и на плотной средах, а также в почве и обеспечивать конъюгационный перенос мобилизуемых плазмид (показано для плазмиды р19) [5]. Указанное свойство представлялось весьма существенным, поскольку позволяет внехромосомным генетическим элементам распространяться среди бактерий природных популяций. В связи с этим важно было установить присутствие рBS72-подобных плазмид в клетках природных бактерий, циркулирующих на территории Беларуси в настоящее время (впервые репликон был обнаружен в 1999 г.).

Для обнаружения плазмидсодержащих бактерий использовали метод ПЦР. При этом в качестве матрицы в ПЦР добавляли тотальную ДНК, выделенную из почвы. В настоящее время данный методический прием широко используется для характеристики природных микробных популяций и позволяет устанавливать наличие определенных таксономических групп микроорганизмов (в частности, для выявления патогенов), а также отдельных генетических детерминант, присутствующих в геномах почвенной микрофлоры, включающей в том числе и некультивируемые бактерии [12, 13]. Поскольку почвы характеризуются разным составом и могут содержать соединения, ингибирующие протекание ПЦР (например, гуминовые кислоты), для проверки чистоты выделенной тотальной ДНК реакцию проводили с несколькими типами праймеров. На первом этапе использовали праймеры, обеспечивающие амплификацию фрагментов генов бактериальных 16S рРНК размером 1484 п. н. (рис. 1). Наличие ампликонов искомого размера свидетельствовало о наличии в почвенном образце бактерий, а также о пригодности выделенной ДНК для постановки ПЦР.

Поскольку рBS72-подобные репликоны ранее выявляли только в бактериях *B. subtilis*, предполагали, что плазмидсодержащие штаммы можно обнаружить только в том случае, если в почве присутствуют бактерии этой таксономической группы. Для обнаружения бактерий *B. subtilis* использовали специфические праймеры, обеспечивающие амплификацию фрагмента уникального гена *spoA*. Образование ампликонов искомого размера (481 п. н.) свидетельствовало о присутствии в исследуемом почвенном образце бактерий *B. subtilis* (рис. 2).

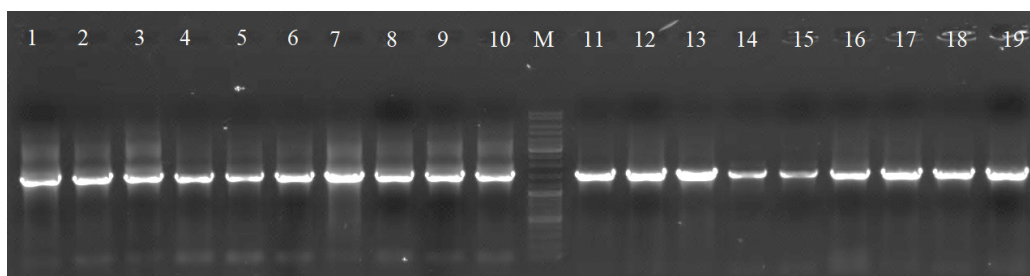


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов амплификации генов 16S рРНК. Номера дорожек соответствуют продуктам ПЦР, полученным с использованием в качестве матрицы тотальной ДНК, выделенной из почвенных образцов: 1 – 1; 2 – 2; 3 – 3; 4 – 4; 5 – 5; 6 – 6; 7 – 7; 8 – 8; 9 – 9; 10 – 10; 11 – 11; 12 – 12; 13 – 13; 14 – 14; 15 – 15; 16 – 16; 17 – 17; 18 – 18; 19 – 19. Дорожка М соответствует реперу 1 kbMix

Fig. 1. Electropherogram of 16S rRNA gene amplification products. The lane numbers correspond to the PCR products obtained using total DNA isolated from soil samples as a template: 1 – 1; 2 – 2; 3 – 3; 4 – 4; 5 – 5; 6 – 6; 7 – 7; 8 – 8; 9 – 9; 10 – 10; 11 – 11; 12 – 12; 13 – 13; 14 – 14; 15 – 15; 16 – 16; 17 – 17; 18 – 18; 19 – 19. The lane M corresponds to the reference 1 kbMix

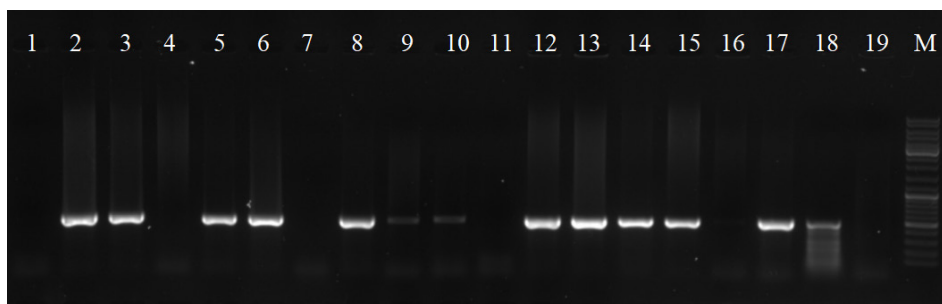


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов амплификации генов *spoA*. Номера дорожек соответствуют продуктам ПЦР, полученным с использованием в качестве матрицы тотальной ДНК, выделенной из почвенных образцов: 1 – 1; 2 – 2; 3 – 3; 4 – 4; 5 – 5; 6 – 6; 7 – 7; 8 – 8; 9 – 9; 10 – 10; 11 – 11; 12 – 12; 13 – 13; 14 – 14; 15 – 15; 16 – 16; 17 – 17; 18 – 18; 19 – без матрицы. Дорожка М соответствует реперу 1 kbMix

Fig. 2. Electropherogram of the *spoA* gene amplification products. The lane numbers correspond to the PCR products obtained using total DNA isolated from soil samples as a template: 1 – 1; 2 – 2; 3 – 3; 4 – 4; 5 – 5; 6 – 6; 7 – 7; 8 – 8; 9 – 9; 10 – 10; 11 – 11; 12 – 12; 13 – 13; 14 – 14; 15 – 15; 16 – 16; 17 – 17; 18 – 18; 19 – without matrix. The lane M corresponds to the reference 1 kbMix

Для выявления плазмид-подобных рBS72 использовали две пары праймеров. Праймеры F2-R2 обеспечивали амплификацию уникальной области плазмиды рBS72 размером 685 п. н. (содержит *orf138* и *orf139*), а праймеры Rep72F-Rep72R – амплификацию *rep*-области размером 1920 п. н., включающей *rep*-ген и *oriV*-сайт (рис. 3).

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 рBS72 (получены ампликоны плазмидной ДНК) (табл. 1).

Таким образом, согласно результатам проведенного исследования, в природных почвенных образцах, содержащих бактерии *B. subtilis*, с частотой 27 % (в 22 образцах из 36 исследованных) выявлены рBS72-подобные репликоны.

Впервые мини-репликон плазмиды рBS72 размером 3081 п. н. был секвенирован и депонирован в GenBank NCBI в мае 2002 г. (регистрационный номер AY102630). Анализ нуклеотидной последовательности *rep*-гена позволил выявить гомологию между С-терминальной последовательностью кодируемого им белка и N-терминальной последовательностью DnaA-белка грамположительных и грамотрицательных бактерий, обеспечивающего инициацию репликации хромосомы. В то же время не обнаружено сходства Rep-белка с гомологичными полипептидами других внехромосомных генетических элементов, на основании чего он был отнесен к новому типу репликонов [11].

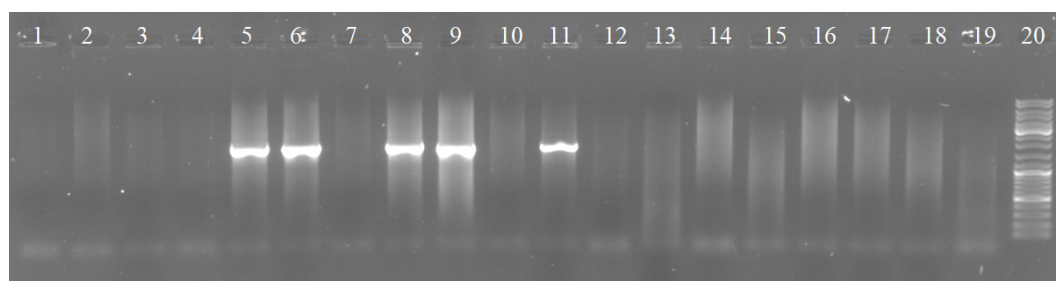


Рис. 3. Электрофореграмма продуктов амплификации *rep*-области плазмиды рBS72. Номера дорожек соответствуют продуктам ПЦР, полученным с использованием в качестве матрицы тотальной ДНК, выделенной из почвенных образцов: 1 – 3; 2 – 8; 3 – 9; 4 – 10; 5 – 2; 6 – 5; 7 – 12; 8 – 6; 9 – 15; 10 – 13; 11 – положительный контроль; 12 – 14; 13 – 19; 14 – 20; 15 – 21; 16 – 24; 17 – 27; 18 – 29, 19 – без матрицы. Дорожка М соответствует реперу 1 kbMix

Fig. 3. Electropherogram of amplification products of the *rep*-region of plasmid рBS72. The lane numbers correspond to the PCR products obtained using total DNA isolated from soil samples as a template: 1 – 3; 2 – 8; 3 – 9; 4 – 10; 5 – 2; 6 – 5; 7 – 12; 8 – 6; 9 – 15; 10 – 13; 11 – positive control; 12 – 14; 13 – 19; 14 – 20; 15 – 21; 16 – 24; 17 – 27; 18 – 29, 19 – without matrix. The lane M corresponds to the reference 1 kbMix

Т а б л и ц а 1. Результаты ПЦР-анализа тотальной ДНК из образцов почвы, изолированной из разных природных источников

T a b l e 1. Results of PCR analysis of total DNA from soil samples isolated from various natural sources

№ почвенного образца	Место выделения	Наличие продуктов ПЦР, полученных с использованием праймеров к генам		
		16S рPHK	<i>spoA B. subtilis</i>	плазмиды pBS72*
1	г. Минск, ул. Кирилла Туровского, 5	+	–	–
2	г. Минск, ул. Академика Купревича	+	+	+
3	г. Минск, пл. Парижской Коммуны, 1	+	+	–
4	г. Минск, ул. Якубовского, 40	+	–	–
5	г. Минск, Площадь Победы	+	+	+
6	г. Минск, Народная, 45	+	+	+
7	г. Минск, ул. Курчатова, 10	+	–	–
8	г. Минск, ул. Пушкина, 75	+	+	–
9	г. Минск, ул. Копиевича, 5	+	+	–
10	г. Минск, ул. Кириенко, 3	+	+	–
11	г. Дзержинск, Минская область	+	–	–
12	г. Минск, ул. Скорины, 11	+	+	–
13	г. Минск, Коммунистическая, 10	+	+	–
14	г. Жодино, Минская область	+	+	–
15	г. Клецк, Минская область	+	+	+
16	д. Зембин, Минская область	+	–	–
17	д. Хатежино, Минская область	+	+	+
18	д. Корсаковичи, Минская область	+	+	+
19	д. Стешицы, Минская область	+	+	–
20	д. Обчак, Минская область	+	+	–
21	д. Углы, Минская область	+	+	–
22	пос. Нарочь, Минская область	+	–	–
23	оз. Нарочь, Минская область	+	–	–
24	оз. Нарочь, Минская область	+	+	–
25	г. Пинск, Брестская область	+	–	–
26	г. Береза, Брестская область	+	–	–
27	д. Самойловичи, Брестская область	+	+	–
28	р. Сервечь, Брестская область	+	–	–
29	д. Стайки, Брестская область	+	+	–
30	г. Ельск, Гомельская область	+	–	–
31	оз. Черное, Гомельская область	+	+	–
32	г. Витебск	+	+	–
33	г. Витебск	+	+	–
34	г. Полоцк, Витебская область	+	–	–
35	г. Глубокое, Витебская область	+	–	–
36	г. Климовичи, Могилевская область	+	–	–

П р и м е ч а н и е. Для реакции ПЦР использовали два типа праймеров – F2-R2 и Rep72F-Rep72R.

Анализ Rep-белка плазмиды pBS72 позволил выявить полностью идентичный (на 100 %) белок, кодируемый геномом бактерий *B. rugosus* SPB7, выделенных из морской воды на территории Индии. Идентичные на 99 % аминокислотные последовательности кодировались геномами разных штаммов бактерий *B. subtilis*, выделенных на территории Пакистана (штаммы MB378 и MB415 из загрязненных нефтепродуктами почв), Нидерландов (штаммы EH11 и DH12 из луговой почвы, штамм B4071 из кари супа) и Китая (штамм 18-3, использующийся в качестве коммерческого пробиотика для животных) (табл. 2).

Таблица 2. Характеристика бактерий, содержащих pBS72-подобные конъюгативные плазмиды
Table 2. Characteristics of bacteria containing pBS72-like conjugative plasmids

Бактерия-хозяин	Размер плазмиды, п. н.	Источник выделения	Страна (№ в GenBank NCBI)	Идентичность белков, %					
				Rep (orf1)	VirD4 (orf24)	VirB4 (orf31)	VirB11 (orf26)	VirB6 (orf28)	Mob (orf37)
<i>B. subtilis</i> 72	102 254	Клумба	Беларусь, Минская обл. (KX711616)	100	100	100	100	100	100
<i>B. subtilis</i> 19	–	Лес	Беларусь, Гродненская обл. (FJ434456)	100	100	100	100	100	100
<i>B. rugosus</i> SPB7	–	Морская вода	Индия (NZ_JABUXO010000030)	100	100	100	100	94	100
<i>B. subtilis</i> MB378	88 605	Почва с нефтью	Пакистан (MBPE01000006)	99	100	100	100	96	100
<i>B. subtilis</i> MB415	94 937	Почва с нефтью	Пакистан (MQSR01000011)	99	100	100	100	96	100
<i>B. subtilis</i> B4071	–	Кари суп	Нидерланды (NZ_JXHN01000026, NZ_JXHN01000027, NZ_JXHN01000031)	99	99	100	98	100	99
<i>B. subtilis</i> EH11	122 937	Почва луговая	Нидерланды (NZ_RPHE01000007)	99	100	100	100	–	99
<i>B. subtilis</i> DH12	117 972	Почва луговая	Нидерланды (NZ_RQRH01000007)	99	100	100	100	99	99
<i>B. subtilis</i> 18-3	–	Коммерческий пробиотик	Китай (NZ_NJRE01000013)	99	99	100	98	96	99
<i>Bacillus</i> sp. CX-120	–	Компост	Китай (NZ_NCTZ01000020)	62	72	80	62	74	60
Плазмиды SX01705-1 <i>B. subtilis</i>	79 987	Субстрат для грибов	Китай (CP022288)	62	71	80	62	74	61
<i>B. licheniformis</i> YNP5-SUWRT508	–	Трава в парке	США (MEDD01000008)	62	71	80	62	74	60
<i>B. licheniformis</i> YNP1-TSU	–	Трава в парке	США (MIGE01000004)	62	71	80	62	74	60
<i>B. paralicheniformis</i> G-1	–	Сухое молоко	Австралия (NZ_AZSK01000003, NZ_AZSK01000013)	62	72	80	62	74	60
Плазмиды 1 <i>B. licheniformis</i>	96 005	Пищевой продукт	Южная Корея (CP035229)	62	72	80	62	74	60

Примечание. «–» – размер плазмидного репликона не установлен.

Белки, отличающиеся от Rep-белка плазмиды pBS72, в большей степени (идентичность составляла 62 %) кодировались плазмидой pSX01705-1 размером 79987 п. н. бактерий *B. subtilis* SX01705 (CP022288), изолированных на территории Китая из субстрата для выращивания грибов, плазмидой 1 размером 96005 п. н. бактерий *B. licheniformis* SRCM103529 (CP035229), выделенных из пищевого продукта в Южной Корее, а также обнаруживались в составе геномов бактерий *B. licheniformis*, изолированных из подогретой воды, контактирующей с травой в парке в США (штаммы YNP1-TSU и YNP1-TSU), и бактерий *B. paralicheniformis* G-1, изолированных из сухого молока в Австралии. При аннотации всех вышеперечисленных геномов данные белки отнесены к разряду гипотетических (табл. 2).

В составе всех вышеперечисленных геномов выявлены гены, кодирующие ключевые белки конъюгационного переноса (VirB4, VirB6, VirB11, VirD4 и Mob). Сходство данных полипептидов, кодируемых геномами бактерий *B. subtilis*, с таковыми плазмиды pBS72 составляло 96–100 %. Гомология с белками плазмид pSX01705-1 и 1 бактерий *B. licheniformis* составляла от 60 до 80 %. Наименьшее сходство было выявлено для релаксаз (Mob) и белков VirB11, в то время как для консервативных белков VirB4 и VirD4, используемых в качестве генетических маркеров для классификации конъюгативных плазмид, сходство превышало 71 % (табл. 2).

Анализ нуклеотидных последовательностей бактерий штаммов *B. subtilis* MB378, MB415, EH11 и DH12, депонированных в GenBank NCBI под номерами MBPE01000006, MQSR01000011, NZ_RPHE01000007 и NZ_RQPH01000007, позволил установить, что они начинаются и заканчиваются фрагментами одной и той же открытой рамки считывания, что позволяет представить их



Рис. 4. Генетическое сходство pBS72-подобных конъюгативных плазмид, установленное с использованием программы Mauve [9]. Одинаковым цветом обозначены гомологичные области плазмидных репликаонов.

Участки белого цвета соответствуют уникальным нуклеотидным последовательностям

Fig. 4. Genetic similarity of pBS72-like conjugative plasmids established using the Mauve program [9]. Homologous regions of plasmid replicons are marked with the same color. Areas in white correspond to unique nucleotide sequences

в виде кольцевых молекул ДНК и определить размер внехромосомного генетического элемента, присутствующего в их клетках (табл. 2). Для остальных геномов, содержащих рBS72-подобные конъюгативные плазмиды, размер внехромосомных генетических элементов установить не представлялось возможным ввиду отсутствия перекрывания контигов, депонированных в GenBank NCBI.

Сравнительный анализ всех нуклеотидных последовательностей, депонированных в GenBank NCBI, с нуклеотидной последовательностью плазмиды рBS72 позволил выявить протяженные участки гомологии в областях локализации систем репликации и конъюгационного переноса (рис. 4).

В то же время в составе плазмид размером 122 937 и 117 972 п. н. бактерий *B. subtilis* штаммов EN11 и DN12 обнаруживались протяженные уникальные нуклеотидные последовательности, в составе которых аннотированы гены, которые детерминируют синтез белков, определяющих устойчивость к ионам меди (WP_124048611.1, WP_124048614.1, WP_124048618.1), участвующих в транспорте тяжелых металлов (WP_124048612.1), обмене азота (WP_061576709.1), регуляции транскрипции (WP_124048619.1), перемещении мобильных генетических элементов (WP_124048623.1, WP_124048624.1) и некоторых других. Присутствие данных детерминант в составе плазмидных репликонов может обеспечивать селективное преимущество содержащим их бактериям. Следует отметить, что ранее было показано, что присутствие плазмиды рBS72 увеличивает выживаемость содержащих ее бактерий *B. subtilis* в условиях стресса (низкая и высокая pH-среды, УФ-облучение, повышенная осмолярность) [14]. Показано, что бактерии *B. subtilis* B4071, выделенные из пищевых продуктов (кари суп), образуют споры, устойчивые к высоким температурным режимам [15]. Определенный интерес представляет плазмидсодержащий штамм *B. subtilis* 18-3, используемый в Китае в качестве коммерческого пробиотика для животных (спекулятивно можно предположить, что некоторые практически важные признаки этих бактерий могут быть связаны с присутствием в их клетках рBS72-подобной конъюгативной плазмиды). Однако следует учитывать, что рBS72-подобные репликоны могут обеспечивать перенос антибиотикорезистентных плазмид среди бактерий природной микрофлоры, а использование плазмидсодержащих бактерий в качестве пробиотических препаратов может принести больше вреда, чем пользы.

Заключение. Таким образом, в результате проведенного исследования установлено, что в изолированных из разных природных источников на территории Беларуси почвенных образцах, содержащих бактерии *B. subtilis*, с частотой 27 % (в 22 образцах из 36 исследованных) выявлены рBS72-подобные репликоны. На основе 99–100 %-ного сходства белков, ответственных за репликацию (Rep-белки) и конъюгацию (белки VirB4, VirB6, VirB11, VirD4, Mob), установлено, что рBS72-подобные конъюгативные плазмиды присутствуют в клетках природных бактерий *B. subtilis*, циркулирующих на территории, Пакистана, Китая и Нидерландов, а также в клетках бактерий *B. rugosus*, изолированных на территории Индии. Сходные репликоны (Rep-белки идентичны на 62 %), способные передаваться путем конъюгации (ключевые белки конъюгации идентичны на 60–80 %), выявлены в бактериях *Bacillus sp.*, *B. licheniformis*, *B. paralicheniformis* и *B. subtilis*, выделенных в США, Австралии, Китае и Южной Корее.

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке БРФФИ (грант № B21-142).

Acknowledgements. This work was carried out with the financial support of the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (grant no. B21-142).

Список использованных источников

1. Antibiotic production and biocontrol activity by *Bacillus subtilis* CL27 and *Bacillus pumilus* CL45 / C. Leifert [et al.] // J. Appl. Bacteriol. – 1995. – Vol. 78, N 2. – P. 97–108. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1995.tb02829.x>
2. Schallmey, M. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production / M. Schallmey, A. Singh, O. P. Ward // Can. J. Microbiol. – 2004. – Vol. 50, N 1. – P. 1–17. <https://doi.org/10.1139/w03-076>
3. 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/10.1111/j.1574-6976.1998.tb00357.x>
4. *Bacillus subtilis* soil isolates: plasmid replicon analysis and construction of a new theta-replicating vector / M. A. Titok [et al.] // Plasmid. – 2003. – Vol. 49, N 1. – P. 53–62. [https://doi.org/10.1016/s0147-619x\(02\)00109-9](https://doi.org/10.1016/s0147-619x(02)00109-9)

5. Plasmid transfer in *Bacilli* by a self-transmissible plasmid p19 from a *Bacillus subtilis* soil strain / E. U. Poluektova [et al.] // *Plasmid*. – 2004. – Vol. 52, N 3. – P. 212–217. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2004.07.001>
6. Secondary metabolite production and the safety of industrially important members of the *Bacillus subtilis* group / C. R. Harwood [et al.] // *FEMS Microbiol. Rev.* – 2018. – Vol. 42, N 6. – P. 721–738. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy028>
7. te Riele, H. Single-stranded plasmid DNA in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* / H. te Riele, B. Michel, S. D. Ehrlich // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 1986. – Vol. 83, N 8. – P. 2541–2545. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.8.2541>
8. Маниатис, Т. Методы генетической инженерии: молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук ; пер. с англ. под ред. А. А. Баева, К. Г. Скрыбина. – М. : Мир, 1984. – 479 с.
9. Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements / A. C. E. Darling [et al.] // *Genome Res.* – 2004. – Vol. 14, N 7. – P. 1394–1403. <https://doi.org/10.1101/gr.2289704>
10. Титок, М. А. Плазмидный состав бактерий *Bacillus subtilis*, выделенных из природных источников / М. А. Титок, А. В. Лагодич, Ю. В. Селезнева // *Вестн. БГУ. Сер. 2.* – 2003. – № 3. – С. 35–38.
11. *Bacillus subtilis* soil isolates: plasmid replicon analysis and construction of a new theta-replicating vector / M. A. Titok [et al.] // *Plasmid*. – 2003. – Vol. 49, N 1. – P. 53–62. [https://doi.org/10.1016/s0147-619x\(02\)00109-9](https://doi.org/10.1016/s0147-619x(02)00109-9)
12. Integrated metagenomics and network analysis of soil microbial community of the forest timberline / J. Ding [et al.] // *Sci. Reports.* – 2015. – Vol. 5. – Art. 7994. <https://doi.org/10.1038/srep07994>
13. Microbial diversity of a mediterranean soil and its changes after biotransformed dry olive residue amendment / J. A. Siles [et al.] // *PLoS ONE.* – 2014. – Vol. 9, N 7. – P. e103035. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103035>
14. Гуринович, А. С. Молекулярно-генетический и функциональный анализ плазмиды pBS72 природных бактерий *Bacillus subtilis* / А. С. Гуринович, М. А. Титок // *Микробиология.* – 2020. – Т. 89, № 6. – С. 646–657.
15. Draft genome sequences of 10 *Bacillus subtilis* strains that form spores with high or low heat resistance / E. M. Berendsen [et al.] // *Genome Announc.* – 2016. – Vol. 4, N 2. – P. e00124–16. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00124-16>

References

1. Leifert C., Li H., Chidburee S., Hampson S., Workman S., Sigeo D., Epton H. A., Harbour A. Antibiotic production and biocontrol activity by *Bacillus subtilis* CL27 and *Bacillus pumilus* CL45. *Journal of Applied Microbiology*, 1995, vol. 78, no. 2, pp. 97–108. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1995.tb02829.x>
2. Schallmeyer M., Singh A., Ward O. P. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Canadian Journal of Microbiology*, 2004, vol. 50, no. 1, pp. 1–17. <https://doi.org/10.1139/w03-076>
3. 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. *FEMS Microbiology Reviews*, 1998, vol. 21, no. 4, pp. 337–368. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1998.tb00357.x>
4. Titok M. A., Chapuis J., Selezneva Y. V., Lagodich A. V., Prokulevich V. A., Ehrlich S. D., Jannièrè L. *Bacillus subtilis* soil isolates: plasmid replicon analysis and construction of a new theta-replicating vector. *Plasmid*, 2003, vol. 49, no. 1, pp. 53–62. [https://doi.org/10.1016/s0147-619x\(02\)00109-9](https://doi.org/10.1016/s0147-619x(02)00109-9)
5. Poluektova E. U., Fedorina E. A., Lotareva O. V., Prozorov A. A. Plasmid transfer in *Bacilli* by a self-transmissible plasmid p19 from a *Bacillus subtilis* soil strain. *Plasmid*, 2004, vol. 52, no. 3, pp. 212–217. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2004.07.001>
6. Harwood C. R., Mouillon J. M., Pohl S., Arnau J. Secondary metabolite production and the safety of industrially important members of the *Bacillus subtilis* group. *FEMS Microbiology Reviews*, 2018, vol. 42, no. 6, pp. 721–738. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy028>
7. te Riele H., Michel B., Ehrlich S. D. Single-stranded plasmid DNA in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. *Proceeding of the National Academy of Sciences. USA*, 1986, vol. 83, no. 8, pp. 2541–2545. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.8.2541>
8. Maniatis T., Fritch E., Sembuk Dzh. *Genetic engineering techniques: molecular cloning*. Moscow, Mir Publ., 1984, 479 p. (in Russian).
9. Darling A. C., Mau B., Blattner F. R., Perna N. T. Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. *Genome Research*, 2004, vol. 14, no. 7, pp. 1394–1403. <https://doi.org/10.1101/gr.2289704>
10. Titok M. A., Lagodich A. V., Selezneva Yu. V. Plasmid composition of *Bacillus subtilis* bacteria isolated from natural sources. *Vestnik Belorusskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya 2: Khimiya. Biologiya. Geografiya* [Bulletin of the Belarusian State University. Series 2: Chemistry. Biology. Geography], 2003, no. 3, pp. 35–38 (in Russian).
11. Titok M. A., Chapuis J., Selezneva Y. V., Lagodich A. V., Prokulevich V. A., Ehrlich S. D., Jannièrè L. *Bacillus subtilis* soil isolates: plasmid replicon analysis and construction of a new theta-replicating vector. *Plasmid*, 2003, vol. 49, no. 1, pp. 53–62. [https://doi.org/10.1016/s0147-619x\(02\)00109-9](https://doi.org/10.1016/s0147-619x(02)00109-9)
12. Ding J., Zhang Y., Deng Y., Cong J., Lu H., Sun X., Yang C., Yuan T., Van Nostran, J. D., Li D., Zhou J., Yang Y. Integrated metagenomics and network analysis of soil microbial community of the forest timberline. *Scientific Reports*, 2015, vol. 5, art. 7994. <https://doi.org/10.1038/srep07994>
13. Siles J. A., Rachid C. T., Sampedro I., García-Romera I., Tiedje J. M. Microbial diversity of a mediterranean soil and its changes after biotransformed dry olive residue amendment. *PLoS ONE*, 2014, vol. 9, no. 7, p. e103035. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103035>

14. Gurinovich A. S., Titok M. A. Molecular genetic and functional analysis of the pBS72 plasmid from *Bacillus subtilis* environmental isolates. *Mikrobiologiya* [Microbiology], 2020, vol. 89, no. 6, pp. 646–657 (in Russian).

15. Berendsen E. M., Wells-Bennik M. H., Krawczyk A. O., de Jong A., van Heel A., Eijlander R. T., Kuipers O. P. Draft genome sequences of 10 *Bacillus subtilis* strains that form spores with high or low heat resistance. *Genome Announcements*, 2016, vol. 4, no. 2, pp. e00124–16. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00124-16>

Информация об авторах

Гуринович Анастасия Сергеевна – мл. науч. сотрудник. Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: nastia.gurinovich96@gmail.com. <https://orcid.org/0000-0002-4381-4499>

Сацункевич Наталья Евгеньевна – мл. науч. сотрудник. Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: nesatsunkevich@gmail.com

Титок Марина Алексеевна – д-р биол. наук, профессор. Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: ma_titok@bsu.by. <https://orcid.org/0000-0002-8623-5083>

Information about the authors

Anastasiya S. Hurynovich – Junior Researcher. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: nastia.gurinovich96@gmail.com. <https://orcid.org/0000-0002-4381-4499>

Natallia E. Satsunkevich – Junior Researcher. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: nesatsunkevich@gmail.com

Marina A. Titok – D. Sc. (Biol.), Professor. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: ma_titok@bsu.by. <https://orcid.org/0000-0002-8623-5083>