

**С.С. Муродова, К.Д. Давранов**

*Национальный университет Узбекистана им. Мирзо Улугбека,  
ул. Вузгордоқ, 4, Ташкент, 100174, Узбекистан*

## **ПЛАЗМИДЫ СОЛЕУСТОЙЧИВЫХ РИЗОСФЕРНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ**

*Пять плазмидных ДНК было выявлено у трех микроорганизмов, входящих в состав микробной композиции «Замин-М». По одной плазмиде содержат клетки штаммов *Bacillus megaterium* СКБ-310 (23,1 т.п.н.) и *Pseudomonas stutzeri* СКБ-308 (55,0 т.п.н.), в то время как в клетках *Bacillus subtilis* СКБ-309 было определено наличие 3 плазмид (48,5 т.п.н., 30,0 т.п.н. и 13,3 т.п.н.). Предполагаем, что эти плазмиды могут нести гены устойчивости к неблагоприятным условиям среды, в том числе к высокому содержанию (10 %) ионов  $Cl^-$  и  $SO_4^{2-}$ .*

*К л ю ч е в ы е с л о в а:* плазмиды, молекулярный размер молекулы ДНК, электрофоретическое разделение.

Плазмиды, являясь необязательными структурными элементами бактерий, могут включать генетические детерминанты, сообщающие, в ряде случаев, селективное преимущество содержащим их клеткам [4]. Они обеспечивают устойчивость к антибиотикам, солям токсичных металлов, ультрафиолетовому облучению, определяют синтез токсинов, антибиотиков, бактериоцинов, могут содержать гены общего клеточного метаболизма, кодировать ферменты систем рестрикции-модификации, деградации органических и неорганических соединений, детерминировать вирулентность, фиксацию азота и многие другие свойства бактерий.

Вышеперечисленные особенности являются причиной широкого распространения плазмидсодержащих бактерий в природной среде обитания, принося ощутимый вред или пользу практической деятельности человека. Такие свойства микроорганизмов, как вирулентность и устойчивость к антибиотикам создают порой серьезные проблемы в сфере здравоохранения и сельского хозяйства, в то время как способности утилизировать многие вещества природного или антропогенного происхождения, а также продуцировать биологически активные соединения могут быть использованы для решения проблем очистки окружающей среды и создания эффективных экологически безопасных технологий [5].

Микробная композиция «Замин-М», созданная на основе высокоактивных и устойчивых к стрессовым условиям внешней среды микроорганизмов, с большой эффективностью используется в сельскохозяйственной практике Узбекистана [2]. Препарат повышает стрессоустойчивость растений в условиях хлоридно-сульфатного засоления, но механизм влияния на растения микроорганизмов, составляющих указанный биопрепарат, не установлен полностью [2].

Целью настоящих исследований являлось изучение состава комплексов внехромосомных ДНК бактерий, входящих в состав препарата «Замин-М».

**Материалы и методы.** Объектами исследований служили 3 штамма бактерий *Bacillus megaterium* СКБ-310, *Pseudomonas stutzeri* СКБ-308, *Bacillus subtilis* СКБ-309 из коллекции промышленно-важных микроорганизмов Института микробиологии АНРУз.

Культуры выращивали в жидкой среде, содержащей (г/л): пептон – 0,5, NaCl – 5,0, мясной экстракт – 1,5, дрожжевой экстракт – 1,5, дистиллированную воду до 1,0 л.

Культивирование бактерий проводили на термостатированной установке для выращивания микроорганизмов при 28 °C и 180 об/мин. В колбы с 250 мл питательной среды вносили посевной материал в расчете 5–10 % объема среды. Продолжительность культивирования – от 72 до 120 часов. К концу культивирования титр клеток составлял 10<sup>9</sup> КОЕ/мл. В посевном материале посторонняя микрофлора отсутствовала.

Выделение «мини-препаратов» плазмидной ДНК бактерий осуществляли по методу, предложенному Бирнбоймом и Долли [6]. Для выделения плазмидной ДНК использованы сферопласты бактериальных культур, полученные при обработке клеток лизоцимом (2 мкг/мл) в ТЕ буфере (0,025 М трис-HCl и 0,01 М ЭДТА, pH 8,0), содержащем 0,05 М глюкозы в течение 30 мин во льду. Полученные сферопласты осаждали центрифугированием при 3500 об/мин, при 4 °C на центрифуге К 24 (Германия) в течение 15 мин. Осадок сферопластов ресуспендировали в растворе следующего состава: 0,15 М NaCl, 0,05 М трис-HCl, pH 8,0, 0,02 М ЭДТА и 2,0 % саркозилат Na. Суспензию выдерживали в течение 30 мин во льду. Полученный лизат разделяли центрифугированием.

Для выделения мегаплазмид использовали метод Экхарда с некоторыми модификациями [3]. Предварительно промытые в GTE буфере (50 mM глюкоза, 10mM ЭДТА, 25 mM Трис-HCl, pH 7,2) биомассы микроорганизмов вносили в лунки агарозного геля и лизировали в буфере, содержащем 0,050 М Трис HCl, 0,02 М ЭДТА, 0,15 М NaCl, 2,0 % SDS, pH 8,0 и протеиназу К (0,2 мг/мл). После инкубации в течение одного часа при 37 °C лизаты подвергали электрофоретическому распределению.

Электрофорез ДНК проводили в 0,8 % агарозном геле в буфере TAE (Трис-ОН – 4,84 г, ледяная уксусная кислота – 1,14 мл, 0,5 М ЭДТА – 4,0 мл в расчете на 1 л, pH 8,2) при силе тока 20–80 мА.

Ширину ячеек и размер агарозных пластинок во всех случаях подбирали в зависимости от условий эксперимента. К пробам, в качестве антиконвекционной жидкости, добавляли глицерин до конечной концентрации 25 %, а в качестве маркеров движения плазмидных ДНК использовали красители бромфеноловый синий и ксиленцианол. В качестве маркера молекулярных размеров плазмид использовали фрагменты гидролиза ДНК фага лямбда эндонуклеазой рестрикции HindIII. По окончании процесса электрофоретического распределения, плазмидные ДНК окрашивали в течение 30 мин в буфере, содержащем 0,5 мкг/мл бромистого этидия. Гель фотографировали в проходящем ультрафиолетовом свете (БУВ-30).

**Результаты и их обсуждение.** Нами подобран новый состав микроорганизмов, послуживший основой для получения биопрепарата «Замин-М». Микробная композиция создана на базе высокоактивных и устойчивых к стрессовым условиям внешней среды штаммов.

Культуры *Bacillus megaterium* СКБ-310, *Pseudomonas stutzeri* СКБ-308, *Bacillus subtilis* СКБ-309 были выделены из средnezасоленных почв и ризосферы сельскохозяйственных культур. Штаммы были отобраны путем ступенчатой селекции штаммов, растущих в условиях хлоридно-сульфатного (1,5 – 1,7 %) засоления почв и идентифицированы по определителю [7].

В настоящее время данный микробный препарат с большой эффективностью используется в сельскохозяйственной практике Узбекистана [2].

Для выявления фактора, обеспечивающего устойчивость растений в присутствии препарата «Замин-М», проведены эксперименты по изучению плазмидного статуса бактерий, входящих в состав препарата.

В результате электрофоретического разделения полученных препаратов внехромосомной ДНК трех микроорганизмов были обнаружены несколько плазмид различных молекулярных размеров, в том числе и крупных (Таблица).

Культуры исследуемых солеустойчивых ризосферных микроорганизмов содержали плазмиды молекулярным размером от 13,3 т.п.н. до 55,0 т.п.н.

**Таблица**

**Внехромосомные ДНК микроорганизмов, составляющих биопрепарат «Замин-М»**

Культуры микроорганизмов	Количество плазмид	Молекулярный размер плазмид, т.п.н.
<i>Bacillus subtilis</i> СКБ-309	3	48,5, 30,0, 13,3
<i>Bacillus megaterium</i> СКБ-310	1	23,1
<i>Pseudomonas stutzeri</i> СКБ-308	1	55,0

Было выявлено разное количество плазмидных ДНК у исследуемых культур. Так, у штамма *Bacillus subtilis* СКБ-309 было выявлено 3 плазмиды различных молекулярных размеров, в то время как 2 остальных культуры содержали по 1 плазмиде. Плазида с наибольшим молекулярным размером была обнаружена у грамотрицательной аэробной неспорообразующей бактерии *Pseudomonas stutzeri* СКБ-308.

В состав микробного комплекса «Замин-М» входят 2 штамма, принадлежащих к различным видам рода *Bacillus* – аэробных спорообразующих грамположительных микроорганизмов. Наши исследования выявили, что оба исследуемые штамма бацилл содержат внехромосомную ДНК, а также выявили наличие различного количества плазмид в клетках этих культур. В клетках бацилл было выявлено как маленькие плазмиды (13,3 т.п.н., 23,1 т.п.н.), так и крупные (48,5 т.п.н.).

Наши данные по разнообразию в количестве и размерах плазмид микроорганизмов коррелируют с результатами других ученых, которые были получены при изучении плазмидных ДНК ряда штаммов бацилл [4, 5, 9–12]. Так, у штамма *Bacillus megaterium* QM B1551 были обнаружены плазмиды с молекулярным размером 5,4 т.п.н. (pBM100), 9,1 т.п.н. (pBM200), 23,3 т.п.н. (pBM300), 53,9 т.п.н. (pBM400) и 108 т.п.н. (pBM700) [9–11]. Из культур различных штаммов вида *Bacillus subtilis* было выделено множество крупномолекулярных плазмид с молекулярными

размерами молекул 70 т.п.н. и более: например, pBS72 (95,0 т.п.н.), p19 (95,0 т.п.н.) и pLS32 (70,0 т.п.н.) [5, 12].

Широко известна роль плазмид псевдомонад в детерминации биодеградации большого числа органических соединений. Особый интерес для людей представляют плазмиды псевдомонад, детерминирующие ферментацию токсичных соединений, например: нафталина (плазида NAH), октана (OCT), салицилатов (SAL), толуола (TOL), ксилола (TOL и XYL) и камфоры (CAM). Показана значительная распространенность среди микроорганизмов (в том числе и рода *Pseudomonas*) плазмидных генов устойчивости к токсичным ионам, например, ртути.

При диссоциации популяции *Bacillus brevis* была выявлена одна большая плазида pAD1 60,0 т.п.н., которая, по мнению авторов, играла важную роль в диссоциации культуры. При элиминации этой плазмиды клетки теряли способность к образованию эндоспор [8].

Подробно изучена и диссоциация популяции *Bacillus cereus*. Было обнаружено появление 4-х вариантов культуры, различающихся по удельной скорости роста и накоплению биомассы, активности протеолитических ферментов и скорости спорообразования [1]. По мнению авторов, эти характеристики являются адаптивными механизмами популяции, которые позволяют ей более гибко реагировать на изменения условий среды [1].

Таким образом, установлено, что бактерии микробного комплекса «Замин-М» содержат плазмидные ДНК размерами 55,0 т.п.н. (*Pseudomonas stutzeri* СКБ-308), 48,5 т.п.н., 30,0 т.п.н., 13,3 т.п.н. (*Bacillus subtilis* СКБ-309) и 23,1 т.п.н. (*Bacillus megaterium* СКБ-310). Эти штаммы микроорганизмов проявляют высокую отзывчивость к колонизации, антагонистическую активность их метаболитов по отношению к фитопатогенам в условиях хлоридного и сульфатного стресса по сравнению с другими изученными нами коллекционными штаммами.

Анализируя полученные нами результаты и литературные данные, мы пришли к выводу, что устойчивость штаммов микроорганизмов к солевому стрессу может коррелировать с наличием у них крупномолекулярных плазмид. Предполагаем, что выявленные плазмиды могут содержать гены, детерминирующие капсулообразование, ферментативную активность и устойчивость к антибиотикам.

Мы полагаем, что полученные результаты позволят лучше понять закономерности участия внехромосомной ДНК бацилл и псевдомонад в защите клеток от неблагоприятных условий внешней среды.

**С.С. Муродова, К.Д. Давранов**

*Национальный университет Узбекистану им. Мирзо Улугбека,  
вул. Вузгородок, 4, Ташкент, 100174, Узбекистан*

## **ПЛАЗМІДИ СОЛЕСТІЙКИХ РИЗОСФЕРНИХ МІКРООРГАНІЗМІВ**

### **Резюме**

П'ять плазмідних ДНК були виявлені у трьох мікроорганізмів, що входять до складу мікробної композиції «Замін-М». По одній плазміді містять клітини штамів *Bacillus megaterium* СКБ-310 (23,1 т.п.н.) і *Pseudomonas stutzeri* СКБ-308 (55,0 т.п.н.), у той час як у клітинах *Bacillus subtilis* СКБ-309 було визначено наявність 3 плазмід

(48,5 т.п.н., 30,0 т.п.н. і 13,3 т.п.н.). Передбачається, що означені плазмідні можуть нести гени стійкості до несприятливих умов середовища, у тому числі до високого вмісту (10 %) іонів  $\text{Cl}^-$  і  $\text{SO}_4^{2-}$

К л ю ч о в і с л о в а: плазмідні, молекулярний розмір молекули ДНК, електрофоретичний поділ.

**S.S. Murodova, K.D. Davranov**

*Mirzo Ulugbek National University of Uzbekistan  
4 Vuzgorodok St., Tashkent, 100174, Uzbekistan*

## PLASMIDS OF SALT-TOLERANT RHIZOSPHERE MICROORGANISMS

### S u m m a r y

Five plasmid DNAs were detected in three of microorganisms, which formed microbial composition «Замин-М». One plasmid (23.1 kb) was found in *Bacillus megaterium* СКБ-310 cells and another one (55.0 kb) was found in cells of *Pseudomonas stutzeri* СКБ-308, but cells of *Bacillus subtilis* СКБ-309 contained 3 plasmids (48.5 kb, 30.0 kb and 13.3 kb). It was assumed that these plasmids may carry genes of resistance to adverse environmental conditions, including the high content (10 %) of ions  $\text{Cl}^-$  and  $\text{SO}_4^{2-}$

К е у w o r d s: plasmid, molecular length of DNA molecule, electrophoretic division.

1. Дорошенко Е.В., Лойко Н.Г., Ильинская О.Н., Колтаков А.И., Горнова И.Б., Климанова Е.В., Эль-Регистан Г.И. Характеристика диссоциантов *Bacillus cereus* // Микробиология. – 2001. – 70, № 6. – С. 811–819.
2. Муродова С.С., Гафурова Л.А., Файзуллаев Б.А., Махкамова Д.Ю., Тиллаев Э.Т., Сайдалиев Б. Новый полифункциональный биопрепарат для повышения биологической активности засоленных почв // Вестник НУУз. – 2013. – № 4/2. – С. 201–207.
3. Муродова С.С., Юсупов Т.Ю., Имамходжаева А.С., Мурадов М.М. Сравнительный анализ электрофоретического состава белков местных и трансформированных штаммов клубеньковых бактерий маша *Bradyrhizobium Vigna radiate* // Химия природных соединений. – 1999. – 35, № 5. – С. 651–654.
4. Новикова И.И. Биологическое основание создания и применения полифункциональных биопрепаратов на основе микробов-антагонистов для фитосанитарной оптимизации агроэкосистем: Автореф. дис. д-ра биол. наук. – Москва, 2005. – 43 с.
5. Тумок М.А. Плазмиды грамположительных бактерий. – Минск: БГУ, 2004. – 130 с.
6. Birnboim H.C., Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA // Nucleic. Acids Res. – 1979. – 7, № 6. – P. 1513–1523.
7. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Ninth ed. / Eds. Kreig N.R., Holt J.G. – Baltimore: The Williams and Wilking Co. – 1994. – 787 p.
8. Dobritsa A.P., Dobritsa S.V., Tanyashin V.I. Isolation and characterization of plasmid from the *Bacillus brevis* var. *G.-B.* cells // Mol. Gen. Genet. – 1978. – 164, № 2. – P. 195–204.
9. Eppinger M., Bunk B., Johns M.A., Edirisinghe J.N., Kutumbaka K.K., Koenig S.S., Creasy H.H., Rosovitz M.J., Riley D.R., Daugherty S., Martin M., Elbourne L.D.,

- Paulsen I., Biedendieck R., Braun C., Grayburn S., Dhingra S., Lukyanchuk V., Ball B., Ul-Qamar R., Seibel J., Bremer E., Jahn D., Ravel J., Vary P.S.* Genome sequences of the biotechnologically important *Bacillus megaterium* strains *QM B1551* and *DSM319* // *J. Bacteriol.* – 2011. – 193, № 16. – P. 4199–4213.
10. *Kunnimalaiyaan M., Vary P.S.* Molecular characterization of plasmid pBM300 from *Bacillus megaterium QM B1551* // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2005. – 71, № 6. – P. 3068–3076.
11. *Scholle M.D., White C.A., Kunnimalaiyaan M., Vary P.S.* Sequencing and characterization of pBM400 from *Bacillus megaterium QM B1551* // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2003. – 69, № 11. – P. 6888–6898.
12. *Tanaka T., Ogura M.* A novel *Bacillus natto* plasmid pLS32 capable of replication in *Bacillus subtilis* // *FEBS Lett.* – 1998. – 422, № 2. – P. 243–246.

Отримано 03.12.2015