

**С.С. Муродова, К.Д. Давранов**

Национальный университет Узбекистана имени Мирзо Улугбека,  
ул. Студенческая, 4, 100174, Ташкент, Узбекистан,  
e-mail: ssmuradova@rambler.ru, k\_davranov@mail.ru

## **АНАЛИЗ ПЛАЗМИДНОГО СОСТАВА ДНК СОЛЕУСТОЙЧИВЫХ ШТАММОВ РИЗОСФЕРНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ**

*Целью исследований являлось изучение и анализ состава плазмид солеустойчивых бактерий *Bacillus subtilis* СКБ-309, *Bacillus megaterium* СКБ-310 и *Pseudomonas stutzeri* СКБ-308, входящих в состав препарата «Замин-М». Микробная композиция «Замин-М» на основе высокоактивных и устойчивых к стрессовым условиям внешней среды бактериальных штаммов, успешно используется в сельскохозяйственной практике Узбекистана. **Методы.** Бактерии, служащие объектами исследований, выделены из среднесоленых почв и ризосферы сельскохозяйственных культур и отселекционированы путем ступенчатого скрининга штаммов, растущих, в присутствии 3–5 и 7% NaCl в питательной среде и идентифицированы по Bergey. **Результаты.** В результате электрофоретического анализа плазмидной ДНК солеустойчивых штаммов микроорганизмов по методу Birnboim и Dollı были выявлены плазмидные ДНК размерами 48,5; 30 и 13,3 тысяч пар нуклеотидов (т.п.н.) у *B. subtilis*, 23,1 т.п.н. у *B. megaterium* и 55 т.п.н. у *P. stutzeri* СКБ-308. Предполагается, что эти плазмиды могут нести гены устойчивости бактерий к неблагоприятным условиям среды, в том числе к высокому содержанию (7%) токсических ионов Cl<sup>-</sup>.*

*Ключевые слова:* бактерии, плазмидная ДНК, микробная композиция «Замин-М», электрофоретический анализ.

Плазмиды, являясь необязательными генетическими элементами бактерий, могут включать детерминанты, обеспечивающие в ряде случаев селективное преимущество, содержащим их клеткам [3]. Они обеспечивают устойчивость к антибиотикам, солям тяжелых металлов, ультрафиолетовому облучению, определяют продукцию токсинов, антибиотиков, бактериоцинов, содержат гены общего клеточного метаболизма, функции систем рестрикции и модификации, деградации органических и неорганических соединений, детерминировать признаки вирулентности, фиксации азота, и многие другие свойства бактерий. Вышеперечисленные особенности являются причиной широкого распространения плазмид-содержащих бактерий в природной среде обитания. В зависимости от свойств, некоторые виды бактерий могут приносить значительный ущерб сельскому хозяйству, однако другие могут быть полностью противоположными по своему действию, стимулируя рост и развитие



растений в различных условиях. Именно благодаря этим свойствам ростстимулирующие бактерии стали использоваться в качестве основы микробных биопрепаратов в практике растениеводства. [4]. Одним из таких препаратов является микробная композиция «Замин-М», разработанная нами на основе высокоактивных и устойчивых к стрессовым условиям внешней среды, штаммов *B. subtilis* СКБ-309, *B. megaterium* СКБ-310, *P. stutzeri* СКБ-308. Препарат с большой эффективностью используется в сельскохозяйственной практике Узбекистана [1]. Многолетними исследованиями доказано, что наибольший урожай хлопка-сырца получен в варианте с Замин-М при замочке семян нормой 2,5 л/т и опрыскивании в фазах бутонизации и цветения-плодообразования нормой расхода 2,0 л/га, при этом прибавка урожая составила 3,3 ц/га, что на 8,8% больше контроля. Препарат зарегистрирован Государственной комиссией по средствам химизации и защиты растений республики Узбекистан (Госхимкомиссия) в качестве стимулятора роста и развития хлопчатника в условиях среднего засоления почв.

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

#### Материалы и методы

Объектами исследований служили бактерии *B. subtilis* СКБ-309, *B. megaterium* СКБ-310, *P. stutzeri* СКБ-308, выделенные из средnezасоленных почв и ризосферы сельскохозяйственных культур, которые были отселекционированы путем ступенчатого скрининга штаммов, растущих в присутствии 3–5 и 7% раствора NaCl питательной среды LB и идентифицированы по Bergey [6]. Для идентификации были использованы общепринятые методы изучения культурально-морфологических и физиолого-биохимических признаков [2]. Штаммы хранятся в коллекции промышленно-важных микроорганизмов Института микробиологии АНРУз.

Культивирование бактерий проводили на термостатированной установке для выращивания микроорганизмов УВМТ-12-250 (НПО ЭЛИОН, Россия) с частотой вращения 220 об/мин при 28 °С в течение 72 часов в 250 мл мясо-пептонного бульона (МПБ, продукт компании HIMEDIACA), концентрация посевного материала составляла 5–10%. К концу культивирования титр клеток составлял 10<sup>9</sup> КОЕ/мл. В посевном материале посторонняя микрофлора отсутствовала.

Выделение плазмидной ДНК бактерий осуществляли по методу, описанному Birnboim и Dolli [7].

Для выделения плазмидной ДНК использованы свежие культуры микроорганизмов, выращенные в жидкой среде мясо-пептонного бульона (МПБ, продукт компании HIMEDIACA), содержащей 7% (1,2М) NaCl в течение 3 дней, при 28 °С интенсивной аэрации. Сферопласты бактериальных культур получены при обработке клеток лизоцимом (2 мкг/мл) в GTE буфере (Glukosa, Tris, EDTA), состоящим из 0,025 М трис-НСl и 0,01 М ЭДТА, рН 8,0 содержащим 0,05 М глюкозу в течение 30 мин во льду. Полученные сферопласты осаждали



центрифугированием при 3500 об/мин и температуре 4 °С на центрифуге К-24 (Германия) в течение 15 мин. Осадок сферопластов ресуспендировали в среде с 0,15 М NaOH и 2% SDS, выдерживали в течение 5 мин на льду, добавляли 150 мкл 3М ацетата натрия. Суспензию сферопластов осаждали центрифугированием в течение 10 мин при 10000 об/мин, удалив осадок к супернатанту добавляли 2,5 объема этилового спирта. После этого центрифугировали при 10000 об/мин в течение 5 мин. Осадок промывали 70% раствором спирта и растворяли в ТЕ буфере (10 мМ Трис-HCl, 10 мМ ЭДТА, pH 8,0).

Электрофорез ДНК проводили в горизонтальных 1% агарозных пластинках в буфере 1xTAE pH 8,2 (Трис – 4,84 г, 1,14 мл – ледяной уксусной кислоты, 4 мл – 0,5 М ЭДТА в расчете на 1 л), при силе тока 20–80 мА.

Ширину ячеек и размер геля во всех случаях подбирали в зависимости от условий эксперимента. К пробам в качестве антиконвекционной жидкости добавляли глицерин до 25%, а в качестве маркеров использовали красители бромфеноловый синий и ксиленианол.

По окончании электрофореза гель окрашивали в течение 30 мин в электродном буфере, содержащем 0,5 мкг/мл бромистого этидия. Гель фотографировали в проходящем ультрафиолетовом свете (на приборе Alphamager, USA).

### Результаты и их обсуждение

В течение нескольких лет проводятся испытания нового биопрепарата комплексного действия «Замин-М», который составлен на основе солеустойчивых штаммов *B. subtilis* СКБ-309, *B. megaterium* СКБ-310, *P. stutzeri* СКБ-308. Изучение солеустойчивости штаммов было проведено путем выращивания изолятов при концентрации 3–5 и 7% NaCl в питательной среде LB. Штаммы, которые образовали колонии в присутствии 7% NaCl отбирали как солеустойчивые и использовали как основу биопрепарата. Солеустойчивые штаммы в комплексе проявили высокую активность в росте и развитии растений хлопчатника в условиях хлористого засоления. Однако, механизм влияния микроорганизмов на растения, участвующих в составе вышеназванного биопрепарата, остается не выясненным.

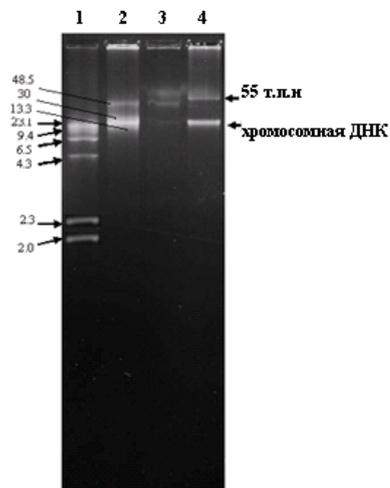
В настоящее время в научной литературе широко обсуждается вопрос о механизмах солеустойчивости ризосферных микроорганизмов и их влияние на растения [8, 10, 11, 12]. По данным литературы ризосферные бактерии, стимулирующие рост растений, синтезируют фермент, способный регулировать уровень этилена в растении. Этот фермент, 1-аминоциклопропан-1-карбоксилат – деаминаза, гидролизует 1-аминоциклопропан-1-карбоксилат – непосредственный предшественник этилена при биосинтезе в растениях [5] и играет важную роль во взаимодействии растения и микроорганизмов [11].

На сегодняшний день предложена модель регуляции транскрипции гена, кодирующего АЦК-деаминазу. Выделено и охарактеризовано как минимум 6 генов, которые кодируют АЦК-деаминазу у различных микроорганизмов. Большая часть из этих генов имеет структурные различия [11]. Существуют



предположения, что бактериальные *acdS*-гены могут передаваться путем горизонтального переноса, т.е. с помощью плазмид широкого круга хозяев [5, 10, 11]. Итак, исходя из того что гены, ответственные за солеустойчивость ризобактерий, могут располагаться во внехромосомных элементах бактерий, наши исследования были направлены на изучение плазмидного состава солеустойчивых штаммов микроорганизмов.

С целью получения «мини-препаратов» плазмидной ДНК была использована щелочная денатурация, в результате которой обнаружены несколько крупных плазмид. Электрофоретическим анализом (рис.) были выявлены плазмидные ДНК размерами 48,5; 30 и 13,3 т.п.н. у *B. subtilis* СКБ-309, 23,1 т.п.н. у *B. megaterium* СКБ-310 и 55 т.п.н. у *P. stutzeri* СКБ-308 (рис.).



**Рис. Электрофореграмма тотальной ДНК бактерий в 1% агарозном геле.**

1 – Маркер молекулярной массы ДНК (ДНК фага  $\lambda$ , расщепленный ферментом рестрикции HindIII); 2 – *Bacillus subtilis* СКБ-309; 3 – *Bacillus megaterium* СКБ-310; 4 – *Pseudomonas stutzeri* СКБ-308.

**Fig. The electrophoregram of bacterial total DNA in 1% agarose gel.**

1 – marker of molecular DNA mass (DNA phage  $\lambda$ , decomposed by restriction HindIII enzyme); 2 – *Bacillus subtilis* СКБ-309; 3 – *Bacillus megaterium* СКБ-310; 4 – *Pseudomonas stutzeri* СКБ-308.

Сравнительный электрофоретический анализ показал, что изученные бактерии содержат плазмидные ДНК размерами 48,5, 30 и 13,3 т.п.н. – *B. subtilis* СКБ-309, 23,1 т.п.н. – *B. megaterium* СКБ-310 и 55 т.п.н. – *P. stutzeri* СКБ-308 (рис.). Все изученные штаммы микроорганизмов проявляют высокую отзывчивость колонизацию, антагонистическую активность к фитопатогенам в условиях хлоридного стресса по сравнению с другими коллекционными штаммами [1].

Аналогичные данные встречаются в работах Zowadzki [13] при изучении плазмидных ДНК трех видов бактерий рода *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. mojavensis*, *B. licheniformis*), где были выявлены 18 плазмид из пустынных почв разных географических регионов. Размер выделенных плазмид варьировал от 6,9 до 16 т.п.н и две из них размером 8,5 до 7,5 т.п.н имели доминантные сайты генов солеустойчивости, которые возможно находятся в пределах 4470 и 4870 н.т. Hasnain и др. [9] при изучении солеустойчивых бактерий *Bacillus pumilus* были выделены и секвенированы две плазмиды *pSH1418* и *pSH1451*. Авторы предполагают, что продукты *orf4* и *orf5* (openreadingframes – *orf*) могут работать вместе, чтобы транспортировать молекулы, такие как аспарат ионы, что может способствовать осмоотолерантности бактерий.



На основе полученных результатов и анализа литературных данных можно сделать вывод, что устойчивость вышеуказанных штаммов к солевому стрессу, возможно, связана с наличием в них плазмид, содержащих гены солеустойчивости. Возможно, эти гены участвуют в транспорте аспаратат ионов, либо содержат *acdS*-гены, которые косвенно участвуют в осмотолерантности ризосферных бактерий.

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

National University of Uzbekistan named after Mirzo Ulugbek,  
Vuzgorodok, Student street-4, 100174, Tashkent, Uzbekistan  
e-mail: ssmuradova@rambler.ru, k\_davranov@mail.ru

## ANALYSIS OF DNA PLASMID COMPOSITION OF SALT TOLERANT STRAINS OF RHIZOSPHERE MICROORGANISMS

### Summary

**The aim.** The object of researches was study and analysis of plasmids composition of salt tolerant bacteria *Bacillus subtilis* SKB-309, *Bacillus megaterium* SKB-310 and *Pseudomonas stutzeri* SKB-308 which are the part of "Zamin-M" preparation. The microbial composition «Zamin-M» on the basis of high-active and stable to stressful environmental conditions bacterial strains is successfully applied in agricultural practice of Uzbekistan. **Methods.** Bacteria which were the objects of researches are isolated from middle-saline soils and crops rhizosphere and selected by step screening of the strains growing in presence of 3–5 and 7% NaCl in growth medium and identified by Bergey. **Results.** As a result of electrophoretic analysis of plasmid DNA of salt-tolerant microbial strains by Birnboim and Dolli method the plasmid DNA with dimensions 48.5, 30 and 13.3 kb (kilobase) at *B. subtilis*, 23.1 kb at *B. megaterium* and 55 kb at *P. stutzeri* SKB-308 have been revealed. It is supposed that these plasmids can keep the genes of bacterial resistance to adverse environmental conditions, including high content (7%) of Cl<sup>-</sup> toxic ions.

**Key words:** bacteria, plasmid DNA, "Zamin-M" microbial composition, electrophoretic analysis.

**С.С. Муродова, К.Д. Давранов**

Національний університет Узбекистану імені Мирзо Улугбека,  
вул. Студентська, 4, 100174, Ташкент, Узбекистан,  
e-mail: ssmuradova@rambler.ru, k\_davranov@mail.ru

## АНАЛІЗ ПЛАЗМІДНОГО СКЛАДУ ДНК СОЛЕСТІЙКИХ ШТАМІВ РИЗОСФЕРНИХ МІКРООРГАНІЗМІВ

### Реферат

**Метою** досліджень було вивчення складу плазмід солестійких бактерій *Bacillus subtilis* СКБ-309, *Bacillus megaterium* СКБ-310 і *Pseudomonas stutzeri* СКБ-308, що входять до складу препарату «Замін-М». Мікробна композиція «Замін-М» на основі високоактивних та стійких до стресових умов зовнішнього середовища бактеріальних штамів, з успіхом застосовується в сільськогосподарській практиці Узбекистану. **Методи.** Бактерії, що слугували об'єктами досліджень,



вилучені з середньозасолених ґрунтів та ризосфери сільськогосподарських культур і відселекціоновані шляхом посходинкового скринінгу штамів, що ростуть у присутності 3–5 і 7% NaCl в живильному середовищі та ідентифіковані по Bergey. **Результати.** В результаті електрофоретичного аналізу плазмідної ДНК солестійких штамів мікроорганізмів за методом Birnboim і Dolli були виявлені плазмідні ДНК розміром 48,5; 30 і 13,3 тисяч пар нуклеотидів (т.п.н.) у *B. subtilis*, 23,1 т.п.н. у *B. megaterium* та 55 т.п.н. у *P. stutzeri* СКБ-308. Припускається, що ці плазмиди можуть нести гени стійких бактерій до несприятливих умов середовища, в тому числі до високого вмісту (7%) токсичних іонів Cl<sup>-</sup>.

*Ключові слова:* бактерії, плазмідна ДНК, мікробна композиція «Замін-М», електрофоретичний аналіз.

### СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. 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.
2. Нетрусов А.И., Егорова М.А., Захарчук Л.М. Практикум по микробиологии. – М.: Издательский центр «Академия», 2005. – 608 с.
3. Туток М.А. Плазмиды грамположительных бактерий. — Мн.: БГУ, 2004. – 130 с.
4. Муродова С.С., Давранов К.Д. Комплексные микробные препараты. Применение в сельскохозяйственной практике // Biotechnologia Acta, V. 7, № 6, 2014. – С. 92–101.
5. Шульга А.О., Мельникова А.А., Кысса Ю.И., Лагодич А.В., Храмова Е.А. Клонирование *acds*-гена бактерий *Pseudomonas putida* B-37 // Труды БГУ. – 2013. № 8. – С. 196–201.
6. Berge's Manual of Determinative Bacteriology. Ninth Edition / Eds. Kreig N.R., Holt J.G. Baltimore: The Williams and Wilkins Co., 1994.—787 p.
7. Birnboim H.C., Dolly J.A. Rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA // Nucleic Acids Res. – 1979. 24;7(6): P. 1513–1523.
8. Glick B.R. Phytoremediation: synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment / B.R. Glick // Biotechnol. Adv. – 2003. – V. 21. – P. 383–393.
9. Hasnain S., Thomas C.M. Two related rolling circle replication plasmids from salt-tolerant bacteria // Plasmid. – 1996. № 36. – P. 191–199.
10. Hontzeas N. et al. Dobritsa A.P., Dobritsa S.V., Tanyashin V.L. Isolation and characterization of plasmid from the *Bacillus brevis* var Q.-B. Cells // Mol. Gen. Genet. – 1978. – № 164. – P. 195–204.
11. Hontzeas N. et al. Evidence for horizontal transfer of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase genes // Appl. Environ. Microbiol. – 2005. – V. 71. – P. 7556–7558.
12. Principles of Plant-Microbe Interactions // Lugtenberg (ed). Switzerland.: Springer international Publishing, 2015. – 450 p.
13. Zawadzki P., Riley M.A., and Cohen F.M. Homology among nearly all plasmids infecting three *Bacillus* species // J. Bacteriol. – 1995. – № 178. – P. 191–198.

Стаття надійшла до редакції 11.06.2015 р.

