

ISSN 1561-8323 (Print)
ISSN 2524-2431 (Online)

БИОЛОГИЯ
BIOLOGY

УДК 579.25
<https://doi.org/10.29235/1561-8323-2022-66-1-55-64>

Поступило в редакцию 27.10.2021
Received 27.10.2021

**Н. И. Наумович, А. Э. Охремчук, Л. Н. Валентович, З. М. Алещенкова,
И. Н. Ананьева, Г. В. Сафронова**

Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ГАЛОТОЛЕРАНТНОГО
ШТАММА *PRIESTIA MEGATERIUM* БИМ В-1314Д**

(Представлено академиком А. Г. Лобанком)

Аннотация. *Priestia megaterium* БИМ В-1314Д – галотолерантный штамм, способный расти на средах с содержанием хлорида натрия до 15 % и стимулировать рост растений в условиях засоления. В результате анализа полной нуклеотидной последовательности бактерий *P. megaterium* БИМ В-1314Д установлено, что геном штамма *P. megaterium* БИМ В-1314Д представлен одной кольцевой хромосомой и девятью плазмидами. Последовательность генома депонирована в ГенБанк НЦБИ под номерами CP058262–CP058271. Геном штамма *P. megaterium* БИМ В-1314Д имеет размер 5 984 922 пары оснований со средним содержанием ГЦ-пар 37,7 % и содержит 6 187 открытых рамок считывания, из них 5 978 аннотированы как кодирующие белки, 92 – как псевдогены, 154 – как гены тРНК, 8 – как гены нкРНК и 47 – как гены рРНК. В геноме идентифицированы гены, вероятно ответственные за синтез и транспорт осмолитов бетаина и пролина, транспорт ионов калия, что, предположительно, и обеспечивает адаптацию штамма *P. megaterium* БИМ В-1314Д к осмотическому стрессу. Определены генетические локусы, продукты которых могут участвовать в синтезе фитогормонов и полиаминов, которые, возможно, и обуславливают ростостимулирующую способность изучаемого штамма. В геноме идентифицированы кластеры генов, предположительно детерминирующие синтез вторичных метаболитов, белков холодового и теплового шока, определена локализация генов, связанных с устойчивостью к окислительному стрессу. Данные анализа генома штамма *P. megaterium* БИМ В-1314Д представляют ценную информацию для дальнейшего изучения возможности применения штамма *P. megaterium* БИМ В-1314Д для стимуляции роста растений в условиях засоления.

Ключевые слова: *Priestia*, фитогормоны, галотолерантность, осмолиты, ростостимуляция

Для цитирования. Молекулярно-генетическая характеристика галотолерантного штамма *Priestia megaterium* БИМ В-1314Д / Н. И. Наумович [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2022. – Т. 66, № 1. – С. 55–64. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2022-66-1-55-64>

**Nadezhda I. Naumovich, Artur E. Akhremchuk, Leonid N. Valentovich, Zinaida M. Aleschenkova,
Irina N. Ananyeva, Galina V. Safronova**

Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

**MOLECULAR-GENETIC CHARACTERIZATION
OF HALOTOLERANT STRAIN *PRIESTIA MEGATERIUM* BIM B-1314D**

(Communicated by Academician Anatoly G. Lobanok)

Abstract. *Priestia megaterium* BIM B-1314D is a halotolerant strain able to adapt to osmotic stress. The analysis of a full nucleotide sequence of bacterium *P. megaterium* BIM B-1314D has revealed that the genome of the studied strain is represented by one circular chromosome and nine plasmids, deposited in the database of GenBank NCBI under the registration number CP058262–CP058271. The size of the bacterial genome constitutes 5 984 922 base pairs with an average GC content of 37.7 %. The genome contains 6 187 genes where 5 978 were annotated as protein-encoding, 92 – as pseudogenes, 154 – as tRNA genes, 8 – as ncRNA, 47 – as rRNA. The genes responsible for synthesis and transport of betaine and proline osmolytes and transport of potassium ions ensuring the adaptation of strain *P. megaterium* BIM B-1314D to osmotic stress were local-

ized in the genome. Gene loci were defined encoding production of metabolites involved in the synthesis of phytohormones and polyamines accounting for the growth-promoting microbial ability. Gene clusters determining the synthesis of secondary metabolites, cold and heat shock proteins were revealed in the genome. The genome analysis of strain *P. megaterium* BIM B-1314D provides the valuable data on the bacterial culture for stimulation of the plant growth in the salinized conditions.

Keywords: *Priestia*, phytohormones, halotolerance, osmolytes, growth stimulation

For citation. Naumovich N. I., Akhremchuk A. E., Valentovich L. N., Aleschenkova Z. M., Ananyeva I. N., Safronova G. V. Molecular-genetic characterization of halotolerant strain *Priestia megaterium* BIM B-1314D. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2022, vol. 66, no. 1, pp. 55–64 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2022-66-1-55-64>

Введение. Техногенное засоление почвы вследствие использования в качестве противогололедного реагента галита (технического хлористого натрия) на дорогах в зимний период существенно изменяет содержание и соотношение в почве макро- и микроэлементов, что негативно сказывается на жизнедеятельности растений [1].

Минимизировать негативное влияние хлорида натрия на растения способны азотфиксирующие и фосфатсольбилизирующие бактерии, устойчивые к осмотическому стрессу. Такие солеустойчивые микроорганизмы способны увеличивать обеспеченность растений азотом и фосфором, положительно влиять на регуляцию защитных механизмов растений, активировать антиоксидантные ферменты растений, а также синтезировать фитогормоны и осмопротекторы [2; 3].

Особый интерес представляют широко распространенные в почве галотолерантные бактерии *Priestia megaterium* (ранее *Bacillus megaterium*), характеризующиеся способностью колонизировать различные ткани растений и синтезировать биоактивные соединения. Ранее нами был выделен штамм *P. megaterium* БИМ В-1314Д, способный расти на средах с содержанием хлорида натрия до 15 %, а также стимулировать рост растений в условиях засоления, что делает его перспективным для применения в технологии биоремедиации засоленных почв¹. Однако полностью оценить биотехнологический потенциал штамма возможно только при анализе его наследственной информации. На сегодняшний момент в ГенБанке Национального центра биотехнологической информации США (НЦБИ) имеются 24 полные нуклеотидные последовательности геномов бактерий вида *Priestia megaterium* и большое количество близких к ним представителей рода *Bacillus*, что свидетельствует о большом научном интересе к этой группе бактерий.

Цель работы – молекулярно-генетическая характеристика генома галотолерантного штамма *Priestia megaterium* БИМ В-1314Д.

Материалы и методы исследования. Объектом исследования являлся штамм *P. megaterium* БИМ В-1314Д, выделенный из образца дерново-подзолистой почвы, отобранного в районе Старобинского месторождения калийных солей на территории ОАО «Беларуськалий». Бактерии выращивали на полноценной жидкой среде LB [4]. Выделение геномной ДНК осуществляли, используя набор реактивов «Bacteria DNA Preparation Kit» (PP-206S, Jena Bioscience) согласно прилагаемой инструкции. Для приготовления библиотек ДНК использовался набор реактивов «Nextera XT DNA Library Preparation Kit» (FC-131-1024, Illumina) для последующего секвенирования по методу Иллюмины или набор «Ligation Sequencing Kit» (SQK-LSK109, Oxford Nanopore Technologies) для последующего секвенирования с помощью нанопор. Высокопроизводительное определение нуклеотидных последовательностей проводили на приборе МайСек (MiSeq, Illumina), используя комплект реактивов «MiSeq Reagent Kit v2» (MS-102-2003, Illumina), а также с помощью нанопорового секвенатора МинИон (MinION Mk1B, Oxford Nanopore Technologies) с проточной ячейкой R9.4.1. Для сортировки полученных нанопоровых прочтений использовали программу Varapost v.2020-06-12 [DOI: 10.1109/TCBB.2020.3009780]. Сборку генома осуществляли с помощью программ SPAdes v.3.14.1 [DOI: 10.1002/cpbi.102] и Flye v.2.7.1-b1590 [DOI: 10.1038/s41587-019-0072-8].

Аннотацию генома проводили с помощью веб-сервисов RAST 2.0 (<https://rast.nmpdr.org/>) и PGAP (конвейер аннотации прокариотического генома НЦБИ) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

¹ Штамм галотолерантных бактерий *Bacillus aryabhatai* для стимуляции роста растений в условиях засоления: пат. BY 23256 / З. М. Алещенкова, И. Н. Ананьева, Н. И. Наумович, Г. В. Сафронова, К. И. Евенкова-Чернецова. – Оpubл. 30.10.2020.

genome/annotation_prok/). Сравнение полученных нуклеотидных и аминокислотных последовательностей с доступными последовательностями из баз данных НЦБИ проводили с помощью программы BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Поиск наиболее схожих геномов и расчет средней нуклеотидной идентичности (СНИ) проводили с помощью веб-сервера JSpeciesWS (<http://jspecies.ribohost.com/jspeciesws/>). Поиск профаговых последовательностей осуществляли с помощью веб-сервиса PHASTER (<https://phaster.ca/>). Выявления последовательностей мобильных генетических элементов и систем рестрикции-модификации осуществляли при помощи веб-сервиса ISfinder (<https://isfinder.biotoul.fr/>) и базы данных REBASE (<http://rebase.neb.com/rebase/rebase.html>). Аннотацию и анализ кластеров генов биосинтеза вторичных метаболитов осуществляли при помощи веб-сервиса antiSMASH (<https://antismash.secondarymetabolites.org/#!/start>).

Результаты и их обсуждение. В результате секвенирования и биоинформатической обработки прочтений нами была получена полногеномная нуклеотидная последовательность штамма *P. megaterium* БИМ В-1314Д, которую затем депонировали в базу данных ГенБанка под номерами CP058262–CP058271. Генетический аппарат исследуемой бактерии *P. megaterium* БИМ В-1314Д представлен кольцевой хромосомой и девятью кольцевыми плазмидами. В результате автоматической аннотации генома было определено или предсказано несколько генетических параметров, представленных в табл. 1.

Т а б л и ц а 1. Характеристики генома бактерий *P. megaterium* БИМ В-1314Д, определенные или предсказанные в результате автоматической аннотации

Table 1. Characteristics of *P. megaterium* BIM B-1314D bacterial genome deciphered or predicted upon automatic annotation

Репликон Replicon	ГЦ-состав, % GC, %	Размер, п. н. Size, b. p.	Количество Quantity					
			Генов Genes	БКП CDS	Псевдогенов Pseudo genes	тРНК tRNA	нкРНК ncRNA	рРНК rRNA
Хромосома	38,2	5 187 082	5,375	5 141	68	118	8	40
pBM-Ср-1-1	34,2	173 887	163	152	9	2	–	–
pBM-Ср-1-2	34,3	143 624	154	147	7	–	–	–
pBM-Ср-1-3	33,8	125 581	102	101	1	–	–	–
pBM-Ср-1-4	34,8	110 362	137	115	2	16	–	4
pBM-Ср-1-5	34,8	107 188	111	109	2	–	–	–
pBM-Ср-1-6	35,2	71 521	71	69	2	–	–	–
pBM-Ср-1-7	36,3	51 244	62	40	1	18	–	3
pBM-Ср-1-8	34,3	9 432	10	10	–	–	–	–
pBM-Ср-1-9	33,5	5 001	5	5	–	–	–	–
Итого:	37,7	5 984 922	6 187	5 978	92	154	8	47

П р и м е ч а н и е: БКП – белоккодирующие последовательности; тРНК, нкРНК, рРНК – соответственно транспортные, некодирующие и рибосомные рибонуклеиновые кислоты.

Note: CDS – protein coding sequences; tRNA, ncRNA, rRNA – transport, non-coding and ribosomal ribonucleic acids, respectively.

Нуклеотидная последовательность генома штамма *P. megaterium* БИМ В-1314Д наиболее схожа с геномами штаммов *P. megaterium* NBRC 15308 = ATCC 14581 (CP035094), *P. megaterium* BMS (GCF_000746935), *P. megaterium* NCTC10342 (GCA_900445485) со значением СНИ 95,75 %, а для штамма *P. megaterium* QM B1551 (CP001983) – 98,23 %. А по данным сравнения геномных последовательностей, собранных в базе данных «Геном» НЦБИ, хромосома бактерий штамма *P. megaterium* БИМ В-1314Д наиболее схожа (95 % симметричной идентичности) с хромосомой бактерий штамма *P. megaterium* AFS008968, которые были выделены из почвы в штате Айова в апреле 2014 г. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/biosample/SAMN07597351>).

Анализ общей структуры генома штамма БИМ В-1314Д в сравнении с изученными близкородственными штаммами вида *Priestia megaterium* позволил установить особенности организации генома, характерные для исследуемого штамма (табл. 2).

Т а б л и ц а 2. Сравнительная характеристика генома бактерий *P. megaterium* БИМ В-1314Д с близкородственными штаммами вида *P. megaterium*T a b l e 2. Characteristics of *P. megaterium* BIM В-1314D bacterial genome with closely related strains of species *P. megaterium*

Характеристика Characteristic	Штамм Strain			
	<i>P. megaterium</i> БИМ В-1314Д	<i>P. megaterium</i> NBRC 15308 = ATCC 14581 (CP035094)	<i>P. megaterium</i> QM B1551 (CP001983)	<i>P. megaterium</i> NCT-2 (GCF_000334885)
ГЦ-состав	37,7 %	37,8 %	37,9 %	37,8 %
Размер, п. н.	5 984 922	5 746 548	5 523 192	5 883 957
Количество генов	6 187	5 961	5 694	6 063
Количество БКП	5 978	5 790	5 512	5 860
Количество псевдогенов	92	106	94	175
Количество тРНК	154	122	137	142
Количество нкРНК	8	8	8	8
Количество рРНК	47	41	37	53
Количество плазмид	9	6	7	10

П р и м е ч а н и е: БКП – белоккодирующие последовательности; тРНК, нкРНК, рРНК – соответственно транспортные, некодирующие и рибосомные рибонуклеиновые кислоты.

N o t e: CDS – protein coding sequences; tRNA, ncRNA, rRNA – transport, non-coding and ribosomal ribonucleic acids, respectively.

Сравнительный анализ организации геномов штаммов, представленных в табл. 2, свидетельствует, что размеры генома бактерий штаммов *P. megaterium* NBRC 15308 = ATCC 14581 и *P. megaterium* QM B1551 меньше по размеру анализируемого штамма *P. megaterium* БИМ В-1314Д. Генетический аппарат всех анализируемых штаммов представлен не только хромосомой, но и плазмидами. Максимальное количество плазмид (10) содержится у штамма *P. megaterium* NCT-2, однако размер всего генома не превышает размер исследуемого штамма БИМ В-1314Д, который содержит 9 кольцевых плазмид. Для большинства бактерий вида *P. megaterium* характерно большое количество генов, кодирующих тРНК. Их количество варьирует от 122 у штамма *P. megaterium* NBRC 15308 = ATCC 14581 до 142 у штамма *P. megaterium* NCT-2. Следует отметить, что наибольшее количество тРНК (154 гена) содержится у анализируемого штамма *P. megaterium* БИМ В-1314Д, что может свидетельствовать о высоком уровне синтеза белков и активных процессах метаболизма.

Анализ генетического аппарата штамма *P. megaterium* БИМ В-1314Д позволил выявить два инсерционных элемента, относящихся к семейству IS6 и IS200/IS605. Инсерционный элемент семейства IS6, располагающийся на плазмиде рВМ-Ср-1-1 (HW576_26940), и IS-элемент семейства IS200/IS605 (HW576_18510), локализованный в хромосоме штамма БИМ В-1314Д, представлены одной копией. Также в геноме штамма БИМ В-1314Д были обнаружены шесть неполных предполагаемых профаговых последовательностей, которые схожи с геномами фагов Clostr_phiCTP1_NC_014457, Synech_S_SKS1_NC_020851, Prochl_P_TIM68_NC_028955, Bacill_G_NC_023719, Staphy_SpaA1_NC_018277. Краткая характеристика профагов представлена в табл. 3.

Т а б л и ц а 3. Характеристика профагов бактерий *P. megaterium* БИМ В-1314ДT a b l e 3. Characteristic of prophages bacteria *P. megaterium* BIM В-1314D

Название профага Phage name	Геном фага Phage genome	Локализация в геноме Location in the genome	Локус Locus
Clostr_phiCTP1_NC_014457	Неполный	Хромосома	HW576_00085–HW576_00125
Synech_S_SKS1_NC_020851	Неполный	Хромосома	HW576_01420–HW576_01455
Prochl_P_TIM68_NC_028955	Неполный	Хромосома	HW576_09195–HW576_09230
Bacill_G_NC_023719	Неполный	Хромосома	HW576_11450–HW576_11480, HW576_24740–HW576_24790
Staphy_SpaA1_NC_018277	Неполный	Плаزمида рВМ-Ср-1-6	HW576_30505–HW576_30540

Таким образом, отсутствие в генетическом аппарате бактерий *P. megaterium* БИМ В-1314Д большого количества мобильных генетических элементов свидетельствует о наличии специализированных систем защиты, препятствующих проникновению и репликации фагов. В геноме бактерий *P. megaterium* БИМ В-1314Д были выявлены гены, кодирующие эндонуклеазы рестрикции тип II, расположенные на хромосоме (HW576_14160–HW576_14170 и HW576_18350–HW576_18360) и на плазмиде рВМ-Ср-1-4 (HW576_29160–HW576_29170).

В результате сортировки аннотированных генов по функциональным группам установлено, что наибольшее из определенных веб-сервисом RAST количество генов, вероятно, ответственно за метаболизм аминокислот (452 гена), углеводов (336 генов), белков (259 генов), синтез кофакторов и витаминов (177 генов).

Анализ генома штамма *P. megaterium* БИМ В-1314Д выявил генетические детерминанты, продукты которых, по литературным данным, участвуют в синтезе различных соединений, и, предположительно, обеспечивают выживание клеток данного штамма, а также стимуляцию роста растений в условиях засоления. Наиболее важные и подробно описанные гены представлены в табл. 4.

Т а б л и ц а 4. Генетические детерминанты штамма *P. megaterium* БИМ В-1314Д, предположительно обеспечивающие его выживание и стимуляцию роста растений в условиях засоления

Table 4. Genetic determinants of strain *P. megaterium* BIM В-1314D probably responsible its survival and stimulation of plant growth in the salinized conditions

Название гена Gene name	Локус Locus	Локализация в геноме Location in the genome	Функциональная роль Functional role	Степень сходства нуклеотидных последовательностей, % The degree of nucleotide similarity sequences, %
<i>Синтез вторичных метаболитов</i>				
<i>aepX</i>	HW576_04095	Хромосома	Синтез фосфомицина	99,8 % с <i>P. megaterium</i> Ni2-3 (CP031776)
–	HW576_07310	Хромосома	Синтез алкилрезорцина	100 % с <i>P. megaterium</i> KNU01 (CP041066)
–	HW576_11150	Хромосома	Синтез мерсацидина	99,8 % с <i>P. megaterium</i> Ni2-3 (CP031776)
–	HW576_11370– HW576_11390	Хромосома	Синтез пенинодина	99,3 % с <i>P. megaterium</i> S188 (CP049296)
–	HW576_20735– HW576_20755	Хромосома	Синтез сидерофора петробактина	99,6 % с <i>P. megaterium</i> KNU01 (CP041066)
–	HW576_03430	Хромосома	Синтез каротиноидов	99,8 % с <i>P. megaterium</i> KNU01 (CP041066)
–	HW576_26985– HW576_26995	Плазмида рВМ-Ср-1-1	Синтез пенибациллина	99,7 % с <i>P. megaterium</i> Ni2-3 (CP031776)
<i>Осмотический стресс</i>				
<i>kdpFABC</i>	HW576_15600– HW576_15585	Хромосома	Транспорт ионов K ⁺	99,7 % с <i>P. megaterium</i> QM B1551 (CP001983), <i>P. megaterium</i> KNU01 (CP041066)
<i>ktrB</i>	HW576_19945			
<i>trkHA</i>	HW576_06745– HW576_06230			
<i>gbsB</i>	HW576_25980	Хромосома	Биосинтез бетаина	99,7 % с <i>P. megaterium</i> KNU01 (CP041066)
<i>betB</i>	HW576_25975			
<i>opuABC</i>	HW576_07740– HW576_07750	Хромосома	Транспорт бетаина, пролина и др.	99,8 % с <i>P. megaterium</i> QM B1551 (CP001983),
<i>proA</i>	HW576_11875 HW576_26635	Хромосома	Биосинтез пролина	97,0 % с <i>P. megaterium</i> KNU01 (CP041066)
<i>proB</i>	HW576_26640, HW576_11870			97,0 % с <i>P. megaterium</i> QM B1551 (CP001983)
<i>proC</i>	HW576_10310– HW576_22495	Хромосома	Биосинтез пролина	97,0 % с <i>P. megaterium</i> KNU01 (CP041066)
<i>putP</i>	HW576_09375	Хромосома	Транспорт пролина	99,9 % с <i>P. megaterium</i> JX285 (CP058262)
<i>proP</i>	HW576_17455			

Окончание табл. 4

Название гена Gene name	Локус Locus	Локализация в геноме Location in the genome	Функциональная роль Functional role	Степень сходства нуклеотидных последовательностей, % The degree of nucleotide similarity sequences, %
<i>Температурный стресс</i>				
–	HW576_29090, HW576_29260	Плазмида pBM-Cp-1-4	Устойчивость к холодовому шоку	100 % с <i>P. megaterium</i> NBRC 15308 = ATCC 14581 (CP035094), <i>P. megaterium</i> STB1 (CP025700), <i>P. megaterium</i> KNU01 (CP041066)
	HW576_29830, HW576_29845	Плазмида pBM-Cp-1-5		
	HW576_08610– HW576_08625	Хромосома		
	HW576_09030			
<i>dnaJ</i>	HW576_23245	Хромосома	Устойчивость к тепловому шоку	99,9–100 % с <i>P. megaterium</i> QM B1551 (CP001983), <i>P. megaterium</i> KNU01 (CP041066)
<i>dnaK</i>	HW576_23250			
<i>groES</i>	HW576_01325			
<i>groEL</i>	HW576_01330			
<i>hsp20</i>	HW576_10330			
<i>hslO</i>	HW576_00460			
<i>htpG</i>	HW576_12560			
<i>Окислительный стресс</i>				
<i>sod1</i>	HW576_10940	Хромосома	Устойчивость к супероксидным анион-радикалам	99,6–100 % с <i>P. megaterium</i> KNU10 (CP041519), <i>P. megaterium</i> Ni2-3 (CP031776)
<i>sod2</i>	HW576_14120			
<i>katA</i>	HW576_08845– HW576_26650	Хромосома	Разложение перекиси водорода	
<i>ohrB</i>	HW576_11810	Хромосома	Разложение органических гидропероксидов	
<i>tpx</i>	HW576_24405			
<i>gpx</i>	HW576_10170			
<i>bcp</i>	HW576_02135			
–	HW576_26465			
<i>Синтез индол-3-уксусной кислоты (ИУК)</i>				
–	HW576_25170	Хромосома	Превращение триптофана в промежуточное соединение ИУК	96,9–100 % с <i>P. megaterium</i> 5-3 (CP047699), <i>P. megaterium</i> QM B1551 (CP001983)
–	HW576_06610			
–	HW576_20635– HW576_22510			
<i>hisC</i>	HW576_09395	Хромосома	Превращение индолил-3-пирувата в индолил-3-ацетальдегид	95,7 % с <i>P. megaterium</i> JX285 (CP058262), <i>P. megaterium</i> Ni2-3 (CP031776)
–	HW576_05785	Хромосома	Превращение индолил-3-ацетальдегида в ИУК	100 % с <i>P. megaterium</i> 5-3 (CP047699)
<i>puc</i>	HW576_06895			
–	HW576_01950			
–	HW576_10965	Хромосома	Превращение индолил-3-ацетамида в ИУК	99,3 % с <i>P. megaterium</i> Ni2-3 (CP031776)
<i>ami</i>	HW576_01845	Хромосома	Превращение индолил-3-ацетамида в ИУК	
<i>Биосинтез полиаминов</i>				
<i>speG</i>	HW576_08745	Хромосома	Синтез Nацетилспермидина	99,8 % с <i>P. megaterium</i> 5-3 (CP047699)
<i>speA</i>	HW576_00240	Хромосома	Биосинтез путресцина	100 % с <i>P. megaterium</i> Ni2-3 (CP031776)
<i>speB</i>	HW576_04515	Хромосома		
<i>speD</i>	HW576_24220	Хромосома	Биосинтез спермидина	100 % с <i>P. megaterium</i> 5-3 (CP047699), <i>P. megaterium</i> KNU01 (CP041519)
<i>speE</i>	HW576_04075			

В геноме исследуемого штамма *P. megaterium* БИМ В-1314Д были выявлены кластеры генов, детерминирующих синтез вторичных метаболитов и антибиотиков, которые могут проявлять антагонистическую активность. По представленным в табл. 4 данным, в хромосоме и на плазмиде pBM-Cp-1-1 располагаются гены, продукты которых участвуют в синтезе вторичных метаболитов и антибиотиков, таких как фосфомицин, алкилрезорцин, мерсацидин, пенинодин, пенибацillin, а также локализован кластер генов, ответственный за синтез сидерофора петробактина и каротиноида.

В нуклеотидной последовательности генома штамма *P. megaterium* БИМ В-1314Д установлены генетические детерминанты, продукты которых участвуют в синтезе различных соединений, которые могут быть ответственны за устойчивость штамма к абиотическим стрессам, таким как осмотический, тепловой и окислительный.

В хромосоме исследуемого штамма был выявлен *kdp*-оперон, ответственный за синтез высокоаффинной транспортной системы типа KdpFABC, которая регулирует поступление ионов калия в клетку. По литературным данным известно, что система KdpFABC состоит из четырех белков: АТФазы (KdpB), шаперона АТФазы (KdpC), транспортного белка (KdpA) и вспомогательного мембранного белка (KdpF). Также были обнаружены гены, кодирующие компоненты транспортной системы типа TrkАН и транспортер калия KtrВ. Наличие большого количества генов, ответственных за образование калиевых каналов, позволит предположить, что при увеличении осмотического давления в окружающей среде, бактерии первоначально поглощают большое количество K^+ , чтобы компенсировать отток воды из клетки [5].

В хромосоме штамма *P. megaterium* БИМ В-1314Д были выявлены кластеры генов, ответственных за синтез осмолитов, таких как глицин, бетаин и пролин. Вероятно, что биосинтез бетаина в клетках бактерий исследуемого штамма осуществляется при помощи ферментов алкогольдегидрогеназы III типа (GbsB) и бетаинальдегиддегидрогеназы (BetB), которые осуществляют двухступенчатое окисление холина. Анализ показал и наличие генов, продукты которых участвуют в синтезе компонентов транспортных систем, обеспечивающих перенос глицина, бетаина и его предшественника холина из окружающей среды. Можно предсказать, что транспорт осуществляется с помощью системы типа OpuABC, которая состоит из трех компонентов: OpuAA – АТФ-связывающий белок, OpuAB – интегральный мембранный белок пермеазы и OpuAC – глицин-бетаин-связывающий белок [6; 7].

В геноме штамма *P. megaterium* БИМ В-1314Д локализованы гены *proB*, *proA*, *proC*, вероятно кодирующие ферменты глутамат-5-киназу, γ -глутамилфосфатредуктазу, пирролин-5-карбоксилатредуктазу (соответственно), которые участвуют в синтезе пролина из глутамата. Наличие полного кластера генов, продукты которых могут быть ответственны за синтез пролина предполагает, что у исследуемого штамма возможно функционирует *proBA*-зависимый путь синтеза пролина. В хромосоме бактерий выявлены гены, вероятно ответственные за транспорт пролина из окружающей среды. Ген *putP* кодирует симпортер пролина/натрия, а ген *proP* – транспортер пролина/бетаина. По литературным данным, высокую специфичность и сродство к пролину имеет симпортер пролина/натрия (PutP), в то время как транспортер пролина/бетаина (ProP) способен переносить не только пролин, но и другие осмопротекторы [8; 9].

Как видно из табл. 4, в составе хромосомы штамма *P. megaterium* БИМ В-1314Д обнаружены гены, кодирующие белки-шапероны холодового шока, которые участвуют в стабилизации ДНК и РНК и влияют на эффективность транскрипции и трансляции в условиях холодового шока. Также у исследуемого штамма были идентифицированы гены *dnaJ*, *dnaK*, *groES*, *groEL*, *hsp20*, *hslO* и *htpG*, ответственные за кодирование шаперонов, обеспечивающих устойчивость к тепловому шоку [10].

В составе хромосомы штамма *P. megaterium* БИМ В-1314Д локализованы гены, продукты которых могут участвовать в ответных реакциях на окислительный стресс. Это гены *sod1* и *sod2*, которые кодируют супероксиддисмутазы семейства Cu-Zn и Fe-Mn, гены *katE*, две копии генов *ohrB*, кодирующих каталазу и белки устойчивости к органическому гидропероксиду (соответственно). Также удалось аннотировать гены, синтезирующие тиольную (*tpx*), гем-зависимую пероксидазу, глутатионпероксидазу (*gpx*) и тиоредоксин-зависимую тиолпероксидазу (*bcp*) [11]. Таким образом, наличие большого количества генов устойчивости к окислительному стрессу обеспечивает клеткам потенциальную способность к адаптации к активным формам кислорода (перекиси водорода и органических гидропероксидов).

Эффективным способом повышения стрессоустойчивости растений является инокуляция микроорганизмами, стимулирующими рост растений в условиях осмотического стресса. Многие бактерии-фитостимуляторы способны синтезировать фитогормоны, которые являются ключевыми регуляторами роста и развития растений. Клетки штамма *P. megaterium* БИМ В-1314Д имеют

неполные триптофан-зависимые пути синтеза индол-3-уксусной кислоты (ИУК), такие как индолил-3-ацетамидный и индол-3-пируватный путь. На хромосоме бактерий штамма БИМ В-1314Д локализованы гены, кодирующие аминотрансферазы, пируватоксидазы, пируваткарбоксилазу (*pus*), декарбоксилазу фенольной кислоты, которые участвуют в превращении индолил-3-пирувата в индолил-3-ацетальдегид и две копии гена, участвующие в синтезе альдегиддегидрогеназы, катализирующие превращение индолил-3-ацетальдегида в ИУК. Наличие генетических детерминант, описанных выше в геноме штамма *P. megaterium* БИМ В-1314Д, свидетельствует о том, что штамм способен синтезировать ИУК по индолил-3-пируватному пути [11; 12].

Анализ *in silico* хромосомы штамма *P. megaterium* БИМ В-1314Д показал наличие гена *ami*, кодирующего синтез фермента амидазы, участвующего в превращении индолил-3-ацетамида в ИУК. Полученные данные свидетельствуют, что бактерии *P. megaterium* БИМ В-1314Д также способны синтезировать ИУК и по индолил-3-ацетоамидному пути. Выявленные генетические детерминанты, кодирующие образование ферментов, участвующих в превращении триптофана, индолил-3-пирувата и индолил-3-ацетамида в ИУК, являются высоко консервативными и присутствуют в геномах многих представителей вида *P. megaterium*, что дает основание предположить их функциональную активность в клетках исследуемого штамма. Вместе с тем гены *patB* и *iaaM*, кодирующие синтез ферментов триптофан-трансаминазы и триптофан-2-монооксигеназы, которые превращают триптофан в индолил-3-пируват и индолил-3-ацетамид, в геноме не обнаружены. Таким образом, по результатам генетического анализа можно предположить, что клетки штамма БИМ В-1314Д могут синтезировать ИУК из промежуточных соединений [11; 12].

Полиамины путресцин и спермидин играют важную роль в способности бактерий *Bacillus* и *Priestia* стимулировать рост растений, что значительно повышает их устойчивость к засухе, холоду, засолению за счет усиления антиоксидантной ферментативной активности и усиления экспрессии генов, ответственных за стрессоустойчивость [13]. В хромосоме *P. megaterium* БИМ В-1314Д локализованы несколько генов, продукты которых участвуют в метаболизме и транспорте полиаминов: ген *speA*, кодирующий синтез аргининдекарбоксилазы, и ген *speB*, кодирующий синтез агматиназы, которые участвуют в продукции путресцина. Присутствует несколько копий гена *speD* и *speE*, кодирующих образование S-аденозилметионинкарбоксилазы и спермидинсинтазы, участвующих в биосинтезе спермидина [13]. Потенциальная способность штамма *P. megaterium* БИМ В-1314Д продуцировать полиамины может играть важную роль в стимуляции роста растений в условиях абиотического стресса.

Заключение. В результате проведенного секвенирования и анализа генома бактерий *P. megaterium* БИМ В-1314Д определена особенность его организации: выявлены гены, предположительно ответственные за устойчивость к абиотическим факторам (осмотический, температурный, окислительный стрессы, устойчивость к тяжелым металлам), и гены, обеспечивающие стимуляцию роста растений (биосинтез фитогормонов и полиаминов). Полученные данные свидетельствуют о генетическом потенциале штамма *P. megaterium* БИМ В-1314Д к адаптации при неблагоприятных воздействиях окружающей среды и перспективности его применения для минимизации негативного влияния засоления на растения.

Список использованных источников

1. Кошелева, Н. Е. Засоление и осолонцевание городских почв из-за применения противогололедных реагентов (на примере западного административного округа Москвы) / Н. Е. Кошелева, Н. Ю. Кузьминская, Е. В. Терская // Инженерные изыскания. – 2017. – № 6–7. – С. 64–77.
2. Gunde-Cimerman, N. Strategies of adaptation of microorganisms of the three domains of life to high salt concentrations / N. Gunde-Cimerman, A. Plemenitas, A. Oren // FEMS Microbiology Reviews. – 2018. – Vol. 42, N 3. – P. 353–375. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy009>
3. Role of microorganisms in adaptation of agriculture crops to abiotic stresses / M. Grover [et al.] // World J. Microbiol. Biotechnol. – 2011. – Vol. 27, N 5. – P. 1231–1240. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0572-7>
4. Маниатис, Т. Методы генетической инженерии: молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук / под ред. А. А. Баева, К. Г. Скрыбина. – М., 1984. – 479 с.
5. KtrAB and KtrCD: two K⁺ uptake systems in *Bacillus subtilis* and their role in adaptation to hypertonicity / G. Holtmann [et al.] // Journal of Bacteriology. – 2003. – Vol. 185, N 4. – P. 1289–1298. <https://doi.org/10.1128/jb.185.4.1289-1298.2003>

6. Genetic control of osmoadaptive glycine betaine synthesis in *Bacillus subtilis* through the choline-sensing and glycine betaine – responsive GbsR repressor / G. Nau-Wagner [et al.] // *Journal of Bacteriology*. – 2012. – Vol. 194, N 10. – P. 2703–2714. <https://doi.org/10.1128/jb.06642-11>
7. Osmotic control of *opuA* expression in *Bacillus subtilis* and its modulation in response to intracellular glycine betaine and proline pools / T. Hoffmann [et al.] // *Journal of Bacteriology*. – 2013. – Vol. 195, N 3. – P. 510–522. <https://doi.org/10.1128/jb.01505-12>
8. Osmotically controlled synthesis of the compatible solute proline is critical for cellular defense of *Bacillus subtilis* against high osmolarity / J. Brill [et al.] // *Journal of Bacteriology*. – 2011. – Vol. 193, N 19. – P. 5335–5346. <https://doi.org/10.1128/jb.05490-11>
9. Plant growth-promoting activities and genomic analysis of the stress-resistant *Bacillus megaterium* STB1, a bacterium of agricultural and biotechnological interest / F. X. Nascimentoa [et al.] // *Biotechnology Reports*. – 2020. – Vol. 25. – Art. e00406. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00406>
10. Heinemann, U. Cold-Shock Domains – Abundance, Structure, Properties, and Nucleic-Acid Binding / U. Heinemann, Y. Roske // *Cancers*. – 2021. – Vol. 13, N 2. – Art. 190. <https://doi.org/10.3390/cancers13020190>
11. Genomic Analysis of *Bacillus megaterium* NCT-2 Reveals Its Genetic Basis for the Bioremediation of Secondary Salinization Soil / B. Wang [et al.] // *International Journal of Genomics*. – 2020. – Vol. 2020. – P. 1–11. <https://doi.org/10.1155/2020/4109186>
12. Analysis and cloning of the synthetic pathway of the phytohormone indole-3-acetic acid in the plant-beneficial *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 / J. Shao [et al.] // *Microbial Cell Factories*. – 2015. – Vol. 14. – Art. 130. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0323-4>
13. Rhizobacterial strain *Bacillus megaterium* BOFC15 induces cellular polyamine changes that improve plant growth and drought resistance / C. Zhou [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2016. – Vol. 17, N 6. – Art. 976. <https://doi.org/10.3390/ijms17060976>

References

1. Kosheleva N. E., Kuzminskaya N. Yu., Terskaya E. V. Salinization and solonetzization of urban soils due to the use of deicing agents (by the example of the Western administrative district of Moscow). *Inzhenernyye izyskaniya* [Engineering survey], 2017, no. 6–7, pp. 64–77 (in Russian).
2. Gunde-Cimerman N., Plemenitas A., Oren A. Strategies of adaptation of microorganisms of the three domains of life to high salt concentrations. *FEMS Microbiology Reviews*, 2018, vol. 42, no. 3, pp. 353–375. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy009>
3. Grover M., Ali Sk. Z., Sandhya V., Rasul A., Venkateswarlu B. Role of microorganisms in adaptation of agriculture crops to abiotic stresses. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2011, vol. 27, no. 5, pp. 1231–1240. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0572-7>
4. Maniatis T., Fritsch E., Sambrook G. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982. 2230 p.
5. Holtmann G., Bakker E. P., Uozumi N., Bremer E. KtrAB and KtrCD: two K⁺ uptake systems in *Bacillus subtilis* and their role in adaptation to hypertonicity. *Journal of Bacteriology*, 2003, vol. 185, no. 4, pp. 1289–1298. <https://doi.org/10.1128/jb.185.4.1289-1298.2003>
6. Nau-Wagner G., Opper D., Rolbetzki A., Boch J., Kempf B., Hoffmann T., Bremer E. Genetic control of osmoadaptive glycine betaine synthesis in *Bacillus subtilis* through the choline-sensing and glycine betaine – responsive GbsR repressor. *Journal of Bacteriology*, 2012, vol. 194, no. 10, pp. 2703–2714. <https://doi.org/10.1128/jb.06642-11>
7. Hoffmann T., Wensing A., Brosius M., Steil L., Völker U., Bremer E. Osmotic control of *opuA* expression in *Bacillus subtilis* and its modulation in response to intracellular glycine betaine and proline pools. *Journal of Bacteriology*, 2013, vol. 195, no. 3, pp. 510–522. <https://doi.org/10.1128/jb.01505-12>
8. Brill J., Hoffmann T., Bleisteiner M., Bremer E. Osmotically controlled synthesis of the compatible solute proline is critical for cellular defense of *Bacillus subtilis* against high osmolarity. *Journal of Bacteriology*, 2011, vol. 193, no. 19, pp. 5335–5346. <https://doi.org/10.1128/jb.05490-11>
9. Nascimentoa F. X., Hernándezb A. G., Glick B. R., Rossi M. J. Plant growth-promoting activities and genomic analysis of the stress-resistant *Bacillus megaterium* STB1, a bacterium of agricultural and biotechnological interest. *Biotechnology Reports*, 2020, vol. 25, art. e00406. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00406>
10. Heinemann U., Roske Y. Cold-Shock Domains – Abundance, Structure, Properties, and Nucleic-Acid Binding. *Cancers*, 2021, vol. 13, no. 2, art. 190. <https://doi.org/10.3390/cancers13020190>
11. Wang B., Zhang D., Chu S., Zhi Y., Liu X., Zhou P. Genomic Analysis of *Bacillus megaterium* NCT-2 Reveals its Genetic Basis for the Bioremediation of Secondary Salinization Soil. *International Journal of Genomics*, 2020, vol. 2020, pp. 1–11. <https://doi.org/10.1155/2020/4109186>
12. Shao J., Li Sh., Zhang N., Cui X., Zhou X., Zhang G., Shen Q., Zhang R. Analysis and cloning of the synthetic pathway of the phytohormone indole-3-acetic acid in the plant-beneficial *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9. *Microbial Cell Factories*, 2015, vol. 14, art. 130. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0323-4>
13. Zhou C., Ma Z., Zhu L., Xiao X., Xie Y., Zhu J., Wang J. Rhizobacterial strain *Bacillus megaterium* BOFC15 induces cellular polyamine changes that improve plant growth and drought resistance. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, vol. 17, no. 6, art. 976. <https://doi.org/10.3390/ijms17060976>

Информация об авторах

Наумович Надежда Ивановна – мл. науч. сотрудник. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: naumovichnadezda@yandex.ru.

Охремчук Артур Эдуардович – науч. сотрудник. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: okhrem4ukartur@gmail.com.

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

Алесченкова Зинаида Михайловна – д-р биол. наук, гл. науч. сотрудник. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: z_aleschenkova@tut.by.

Ананьева Ирина Николаевна – канд. биол. наук, доцент, заведующая лабораторией. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: ananeva@mbio.bas-net.by.

Сафронова Галина Владимировна – канд. биол. наук, доцент, вед. науч. сотрудник. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: hsafronava@mail.ru.

Information about the authors

Naumovich Nadezhda I. – Junior Researcher. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: naumovichnadezda@yandex.ru.

Akhremchuk Artur E. – Researcher. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: okhrem4ukartur@gmail.com.

Valentovich Leonid N. – Ph. D. (Biology), Associate Professor, Head of the Laboratory. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: valentovich@mbio.bas-net.by.

Aleschenkova Zinaida M. – D. Sc. (Biology), Chief Researcher. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: z_aleschenkova@tut.by.

Ananyeva Irina N. – Ph. D. (Biology), Associate Professor, Head of the Laboratory. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: ananeva@mbio.bas-net.by.

Safronova Galina V. – Ph. D. (Biology), Associate Professor, Leading Researcher. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: hsafronava@mail.ru.