

ХАРАКТЕР НАСЛЕДОВАНИЯ КАТАБОЛИЧЕСКИХ ПЛАЗМИД ГРУППЫ НЕСОВМЕСТИМОСТИ P-9 В БАКТЕРИЯХ РОДА *Pseudomonas*

© 2019 г. Т. З. Есикова¹, Т. О. Анохина¹, Л. И. Ахметов¹*, И. А. Кошелева¹, А. М. Боронин¹

¹Федеральный исследовательский центр “Пушчинский научный центр биологических исследований РАН”,
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина
Российской академии наук, Московская обл., Пушкино, 142290 Россия

*e-mail: lenarakhmetov@yandex.ru

Поступила в редакцию 04.02.2019 г.

После доработки 02.04.2019 г.

Принята к публикации 11.04.2019 г.

Изучена способность плазмид биодegradации ϵ -капролактама (CAP плазмид), относящихся к P-2, P-7 и P-9 группам несовместимости, и плазмид биодegradации нафталина (NAN плазмид) IncP-9 к конъюгационному переносу в различные виды бактерий рода *Pseudomonas*, в том числе в PGPR штаммы (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria), и характер наследования плазмид в этих штаммах. Показано, что частота конъюгационного переноса всех CAP и NAN плазмид (независимо от принадлежности к группе несовместимости) в PGPR *Pseudomonas* была ниже частоты их переноса в почвенные штаммы *P. putida* в среднем на один порядок. При этом выявлено, что выделение антибиотически активных метаболитов штаммами PGPR *Pseudomonas* не является причиной низкой частоты конъюгационного переноса плазмид биодegradации в них. Обнаружено, что стабильность наследования кatabолических плазмид в неселективных условиях зависит от их принадлежности к той или иной группе несовместимости, а также от штамма бактерии-хозяина. Так, все исследуемые CAP и NAN плазмиды стабильно поддерживались в штаммах почвенных псевдомонад *P. putida* KT2442 и BS394 в течение 100 генераций. Однако в клетках PGPR *Pseudomonas* стабильно поддерживались только CAP плазмиды P-2 и P-7 групп несовместимости. CAP и NAN плазмиды, относящиеся к различным подгруппам IncP-9, полностью элиминировались из клеток ризосферных псевдомонад. Таким образом, в настоящей работе впервые выявлены особенности наследования кatabолических плазмид IncP-9 в клетках PGPR *Pseudomonas*.

Ключевые слова: PGPR *Pseudomonas*, плазмиды биодegradации, группы несовместимости, наследование плазмид.

DOI: 10.1134/S0016675819120038

Одним из перспективных подходов для очистки загрязненных почв является фиторемедиация – совместное применение растений и ассоциированных с ними микроорганизмов. Известно, что некоторые представители ризосферных бактерий рода *Pseudomonas* способны улучшать рост растений за счет синтеза фитогормонов и защиты растений от фитопатогенов [1]. Такие полезные для растений бактерии объединяют в специфическую группу, которую принято называть PGPR *Pseudomonas* (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria). Использование в фиторемедиационных технологиях полифункциональных штаммов, обладающих комплексом полезных признаков, в частности фитостимулирующими свойствами и способностью к биодegradации органических поллютантов, представляется весьма перспективным [2].

Бактерии рода *Pseudomonas* представляют собой большую таксономическую группу видов,

проявляющих огромное метаболическое, физиологическое и генетическое разнообразие [3]. Среди свободноживущих почвенных псевдомонад наиболее часто выделяются *P. putida*, тогда как в ризосфере растений чаще всего представлены другие виды псевдомонад: *P. fluorescens*, *P. chlororaphis* и *P. protegens*. Бактерии *P. aeruginosa* встречаются в клинических материалах, почве и водоемах.

Способность к биодegradации у бактерий рода *Pseudomonas* часто кодируется внехромосомными генетическими элементами – плазмидами биодegradации (D-плазмиды), которые путем конъюгационного переноса обеспечивают распространение кatabолических генов в микробных сообществах и их адаптацию к изменяющимся условиям окружающей среды [4]. В системе классификации плазмид псевдомонад насчитывается 14 групп несовместимости (Inc) [5]. Принадлежность плазмиды к той или иной группе несовместимости определяет

круг ее бактериальных хозяев, способность к стабильному существованию в клетке хозяина, а, следовательно, судьбу генов биодеградации в бактериальных популяциях. Часто способность к утилизации ксенобиотиков и компонентов нефти (капролактама, полициклические ароматические углеводороды, n-алканы и др.) контролируется плазмидами групп несовместимости P-2, P-7 и P-9 [6]. Наши многолетние исследования показали, что наиболее распространенными в загрязненных почвах являются штаммы-деструкторы, содержащие плазмиды IncP-9. Несмотря на достаточно широкий круг бактериальных хозяев, кatabолические плазмиды P-9 группы несовместимости выделяются преимущественно из штаммов *P. putida*, тогда как IncP-7 плазмиды (узкий круг хозяев) обнаруживаются в штаммах *P. fluorescens* [7]. Для использования плазмидосодержащих штаммов-деструкторов в фиторемедиационных технологиях целесообразно изучать перенос кatabолических плазмид и стабильность их наследования в PGPR *Pseudomonas*, а также условия, способствующие распространению плазмид биодеградации в бактериальных популяциях.

Цель настоящей работы – изучение способности кatabолических плазмид IncP-9 (на примере плазмид биодеградации ϵ -капролактама и нафталина) к конъюгационному переносу в штаммы PGPR *Pseudomonas* и характера их наследования в этих штаммах.

В работе были использованы две группы штаммов:

1) варианты штамма *P. putida* BS394 (Cys⁻Sm^RRif^R), содержащие различные CAP и NAN плазмиды, полученные ранее [8, 9]. В экспериментальной работе эти штаммы были использованы в качестве доноров плазмид;

2) реципиентами служили ризосферные штаммы PGPR *Pseudomonas*, являющиеся антагонистами фитопатогенных грибов и бактерий – *P. chlororaphis* PCL1391 [10], *P. fluorescens* 2-79 [11], *P. chlororaphis* BS1393 (BKM B-2188D), *P. chlororaphis* OV17 (BKM B-2391D), *P. protegens* 38a (BKM B-3228D), а также штамм *P. putida* KT2442 (*gfp*Km^RRif^R), выделенный из почвы [12], и *P. aeruginosa* ML4262 (Ile⁻Val⁻Met⁻His⁻Lys⁻), изолированный из клинических материалов [13]. Бактерии культивировали на полноценной среде LB и минеральной среде M9 при температуре 28°C. Источники углерода (глюкоза, капролактама) добавляли в концентрации 0.1% (вес/объем), нафталин наносили на перевернутую крышку чашки Петри. Аминокислоты для ауксотрофных штаммов вносили в минеральную среду в концентрации 20 мкг/мл, антибиотики (стрептомицин, канамицин и рифампицин) – в конечной концентрации 100 мкг/мл.

В работе были исследованы плазмиды биодеградации нафталина pBS216 и NAN7, детермини-

рующие окисление этого соединения до метаболитов цикла Кребса и относящиеся к IncP-9, а также плазмиды биодеградации капролактама pBS262 (IncP-2), pBS270 (IncP-7) и pBS267, pBS268 и pBS265 (все относятся к IncP-9). CAP плазмиды детерминируют разложение синтетического соединения ϵ -капролактама, которое используется для производства нейлона-6, и широко распространены в местах, загрязненных отходами соответствующих химических предприятий [14]. Конъюгационный перенос плазмид осуществляли методом Дана и Гонзалеса [15], частоту переноса определяли отношением числа полученных трансконъюгантов к общему числу клеток донора. Стабильность наследования плазмид проверяли путем последовательных пересевов бактериальной культуры, достигшей стационарной фазы роста в неселективных условиях (LB-бульон) в течение 10 сут (100 генераций), с последующим высевом на полноценную питательную среду и проверкой у колоний сохранности плазмидных маркеров.

Антагонистическую активность штаммов PGPR *Pseudomonas* по отношению к *P. putida* BS394 оценивали капельно-диффузным методом.

Исходя из поставленной цели, в различные штаммы псевдомонад, в том числе почвенные (*P. putida*), ризосферные (*P. chlororaphis*, *P. fluorescens*, *P. protegens*) и клинический изолят *P. aeruginosa* ML4262, при помощи конъюгационного переноса были переданы CAP плазмиды, относящиеся к различным группам несовместимости: P-2 (pBS262), P-7 (pBS270) и P-9 (pBS267, pBS268, pBS265) (табл. 1). Следует отметить, что частота конъюгационного переноса всех CAP плазмид в ризосферные штаммы и в *P. aeruginosa* была ниже частоты их переноса в штаммы *P. putida* в среднем на один порядок и составляла около 10^{-7} – 10^{-8} . Было обнаружено также, что стабильность наследования CAP плазмид при культивировании бактерий в неселективных условиях зависит от их принадлежности к той или иной группе несовместимости, а также от штамма бактерии-хозяина. Так, все исследуемые CAP плазмиды стабильно поддерживались в штаммах *P. aeruginosa* ML4262, *P. putida* KT2442 и BS394 в течение 100 генераций. Однако в клетках ризосферных псевдомонад стабильно поддерживались только плазмиды pBS262 и pBS270, принадлежащие к P-2 и P-7 группам несовместимости соответственно (табл. 1). Плазмиды pBS265, pBS267, pBS268 (все относятся к IncP-9, но выделены из разных географических районов и/или различаются по размерам) полностью элиминировались из ризосферных псевдомонад. Полученные результаты свидетельствуют о том, что CAP плазмиды группы несовместимости P-9, в отличие от плазмид других групп, элиминируются из клеток ризосферных псевдомонад в отсутствие селективного давления.

Таблица 1. Стабильность наследования CAP плазмид в различных штаммах *Pseudomonas*

| Реципиентный штамм | pBS262 IncP-2 450 тпн | pBS270 IncP-7 100 тпн | pBS267 IncP-9 140 тпн | pBS268 IncP-9 100 тпн | pBS265 IncP-9 140 тпн |
|--------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| <i>P. aeruginosa</i> ML4262 | 100* | 100 | 100 | 100 | 100 |
| <i>P. putida</i> KT2442 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| <i>P. putida</i> BS394** | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| PGPR <i>Pseudomonas</i> | | | | | |
| <i>P. chlororaphis</i> BS1393 | 95.7 ± 1.5 | 100 | 1.7 ± 0.6 | 0 | 0 |
| <i>P. chlororaphis</i> OV17 | 57.3 ± 0.6 | 89.7 ± 5.0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>P. protegens</i> 38a | 75.0 ± 2.0 | 97.7 ± 2.5 | 9.7 ± 2.1 | 0 | 12.0 ± 3.0 |
| <i>P. fluorescens</i> 2-79 | 88.7 ± 1.5 | 98.3 ± 2.1 | 0 | 0 | 1.3 ± 0.6 |
| <i>P. chlororaphis</i> PCL1391 | 93.3 ± 3.5 | 100 | 0 | 0 | 6.0 ± 1.0 |

Примечание. * Данные приведены в % после культивирования штаммов в неселективных условиях в течение 100 генераций.
** Донорами плазмид служили природные штаммы-деструкторы капролактама *P. putida*. Во всех остальных скрещиваниях донорами плазмид служили варианты ауксотрофного штамма *P. putida* BS394, содержащие указанные CAP плазмиды.

Известно, что плазмиды IncP-9 характеризуются полиморфностью генетических детерминант, обеспечивающих инициацию репликации [5]. На основании сиквенс-анализа выделено восемь подгрупп плазмид, различающихся по составу нуклеотидных последовательностей *rep*-гена и *oriV*-сайта, при этом CAP плазмиды формируют отдельную подгруппу (γ -подгруппа) в молекулярной классификации плазмид IncP-9. Поскольку *rep*-область служит основной функциональной единицей, определяющей поддержание внехромосомного элемента в бактериальной популяции, представлялось интересным выяснить характер наследования плазмид других подгрупп IncP-9 в клетках почвенных и ризосферных псевдомонад. Для этого был осуществлен перенос имеющихся в нашем распоряжении плазмид биодеградации нафталина pBS216 (δ -подгруппа) и NAN7 (ζ -подгруппа) в соответствующие реципиентные штаммы. Важно отметить, что исследуемые NAN плазмиды формируют отдельные, отличные от CAP плазмид, ветви на филогенетическом дереве плазмид IncP-9 [5].

Донорами плазмид биодеградации нафталина в скрещиваниях служили штаммы *P. putida* BS394 (pBS216) и BS394 (NAN7), полученные нами ранее. Как и в случае CAP плазмид, перенос pBS216 и NAN7 в штамм *P. putida* KT2442 происходил с более высокой частотой (10^{-6} – 10^{-7} на клетку донора), чем в штаммы PGPR *Pseudomonas* (10^{-8} – 10^{-9}). В ходе настоящей работы не удалось перенести исследуемые плазмиды биодеградации нафталина в *P. aeruginosa* ML4262.

Как было сказано выше, штаммы PGPR *Pseudomonas* могут продуцировать антибиотически активные метаболиты, подавляющие рост различных микроорганизмов, что могло снижать численность клеток донорных штаммов при конъюгационном переносе и, следовательно, влиять на частоту переноса плазмид в ризосферные штаммы. В связи с этим была изучена антагонистическая активность PGPR *Pseudomonas* по отношению к *P. putida* BS394. Эксперименты показали, что штаммы *P. chlororaphis* BS1393, OV17, PCL1391, *P. protegens* 38a не подавляли рост *P. putida* BS394 (рис. 1). При этом штаммы *P. chlororaphis* BS1393 и OV17 сохраняли характерную оранжевую пигментацию, что свидетельствовало о продукции ими гидроксипроизводных феназин-1-карбоновой кислоты. Из тестированных ризосферных штаммов только *P. fluorescens* 2-79 проявлял антагонистическую активность по отношению к *P. putida* BS394, тем не менее конъюгационный перенос исследуемых плазмид из *P. putida* BS394 в штамм *P. fluorescens* 2-79 происходил с той же частотой, что и в другие ризосферные псевдомонады. По-видимому, выделение антибиотически активных метаболитов штаммами PGPR *Pseudomonas* не является причиной низкой частоты конъюгационного переноса плазмид биодеградации в них, а обусловлено другими факторами.

Сравнительный анализ стабильности NAN плазмид в бактериях *Pseudomonas* выявил ту же закономерность, что и для CAP плазмид (табл. 2). Плазмиды pBS216 и NAN7 стабильно наследовались в клетках *P. putida* KT2442 и *P. putida* BS394 и с высокой частотой элиминировались из ризосфер-

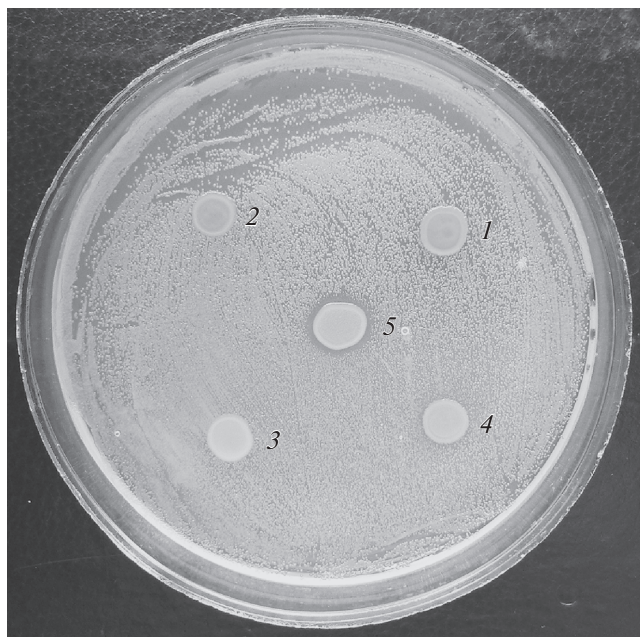


Рис. 1. Влияние ризосферных штаммов на рост *P. putida* BS394. 1 – *P. chlororaphis* BS1393, 2 – *P. chlororaphis* OV17, 3 – *P. chlororaphis* PCL1391, 4 – *P. protegens* 38a, 5 – *P. fluorescens* 2-79 (в центре).

ных штаммов *P. chlororaphis* PCL1391, BS1393, OV17, *P. fluorescens* 2-79 и *P. protegens* 38a. В большинстве случаев плазмиды не обнаруживались в клетках реципиентов уже после 20–30 генераций. Исключение составлял штамм *P. chlororaphis* PCL1391 (pBS216), в котором около 60% популяции сохранили плазмиду после 100 генераций.

Таким образом, в ходе настоящего исследования впервые выявлены особенности наследования каталитических плазмид IncP-9 в клетках ризосферных псевдомонад. На примере CAP и NAN плазмид, относящихся к различным подгруппам IncP-9, показана высокая степень их нестабильности в штаммах PGPR *Pseudomonas*, в отличие от штаммов *P. putida*, которые, вероятно, являются более подходящими хозяевами для этих плазмид. Обнаруженные различия в характере наследования этой группы внехромосомных элементов в различных штаммах бактерий *Pseudomonas*, по-видимому, связаны со специфическим влиянием генома клеток-хозяев на репликацию плазмидной ДНК и распределение вновь образующихся молекул между дочерними клетками. Данная работа приносит дополнительные сведения о характере наследования одной из самых разнообразных и биотехнологически значимых групп внехромосомных генетических элементов, а также указывает на необходимость поиска оптимальных бактериальных хозяев плазмид биodeградации ксенобиотиков при создании эффективных штаммов-деструкторов для использования в фиторемедиации.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Таблица 2. Стабильность наследования NAN плазмид в различных штаммах *Pseudomonas*

| Реципиентный штамм | pBS216 IncP-9 δ-подгруппа | | NAN7 IncP-9 ζ-подгруппа | |
|--------------------------------|---------------------------------|---------------|-------------------------------|---------------|
| | 30 генераций | 100 генераций | 30 генераций | 100 генераций |
| <i>P. putida</i> KT2442 | 100* | 100 | 100 | 98.3 ± 1.5 |
| <i>P. putida</i> BS394** | 100 | 100 | 100 | 100 |
| PGPR <i>Pseudomonas</i> | | | | |
| <i>P. chlororaphis</i> BS1393 | 29.3 ± 2.5 | 0 | 0 | 0 |
| <i>P. chlororaphis</i> OV17 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>P. protegens</i> 38a | 100 | 1.7 ± 0.6 | 0 | 0 |
| <i>P. fluorescens</i> 2-79 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>P. chlororaphis</i> PCL1391 | 80.7 ± 3.5 | 60.0 ± 2.6 | 0 | 0 |

Примечание. * Данные приведены в % после культивирования штаммов в неселективных условиях в течение 100 генераций. ** Донорами плазмид служили природные штаммы-деструкторы нафталина *P. putida*. Во всех остальных скрещиваниях донорами плазмид служили варианты аукохромного штамма *P. putida* BS394, содержащие указанные NAN плазмиды.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gupta G., Parihar S.S., Ahirwar N.K. et al. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Current and future prospects for development of sustainable agriculture // J. Microb. Biochem. Technol. 2015. V. 7. P. 96–102.
<https://doi.org/10.4172/1948-5948.1000188>
2. Siunova T.V., Anokhina T.O., Sizova O.I. et al. Impact of plant growth promoting rhizobacteria *Pseudomonas* in phytoremediation process // Handbook of Phytoremediation / Ed. Golubev I.A. USA, N.Y.: Nova Sci. Publ. Inc., 2011. P. 551–572.
3. Timmis K.N. *Pseudomonas putida*: a cosmopolitan opportunist par excellence // Environ. Microbiol. 2002. V. 4(12). P. 779–781.
<https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2002.00365.x>
4. Smalla K., Jechalke S., Top E.M. Plasmid detection, characterization and ecology // Microbiol. Spectr. 2015. V. 3(1). PLAS-0038-2014.
<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.PLAS-0038-2014>
5. Sevastyanovich Y.R., Krasowiak R., Bingle L.E.H. et al. Diversity of IncP-9 plasmids of *Pseudomonas* // Microbiology. 2008. V. 154. P. 2929–2941.
<https://doi.org/10.1099/mic.0.2008/017939-0>
6. Boronin A.M., Kosheleva I.A. The role of catabolic plasmids in biodegradation of petroleum hydrocarbons // Current Environmental Issues and Challenges / Ed. Cao Giacomo, Orru Roberto. Springer, 2014. P. 159–168.
<https://doi.org/10.1007/978-94-017-8777-2-9>
7. Измалкова Т.Ю., Сазонова О.И., Соколов С.Л. и др. Плазмиды биodeградации нафталина и салицилата Р-7 группы несовместимости в штаммах флуоресцирующих псевдомонад // Микробиология. 2005. Т. 74(3). С. 342–348.
8. Есикова Т.З., Грищенко В.Г., Боронин А.М. Плазмиды биodeградации ϵ -капролактама // Микробиология. 1990. Т. 59(4). С. 547–552.
9. Кочетков В.В., Боронин А.М. Сравнительное изучение плазмид, контролирующих биodeградацию нафталина культурой *Pseudomonas* // Микробиология. 1984. Т. 53(4). С. 639–644.
10. Chin-A-Woeng T.F.C., Bloemberg G.V., van der Bij A.J. et al. Biocontrol by phenazine-1-carboxamide-producing *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 of tomato root rot caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* // Mol. Plant Microbe Interact. 1998. V. 1. P. 1069–1077.
11. Mavrodi D.V., Ksenzenko V.N., Bonsall R.F. et al. A seven-gene locus for synthesis of phenazine-1-carboxylic acid by *Pseudomonas fluorescens* 2-79 // J. Bacteriol. 1998. V. 180. № 9. P. 2541–2548.
12. Eberl L., Schulze R., Ammendola A. et al. Use of green fluorescent protein as a marker for ecological studies of activated sludge communities // FEMS Microbiol. Letters. 1997. V. 149. P. 77–83.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1997.tb10311.x>
13. Sagai H., Hasuda K., Iyobe S. et al. Classification of R plasmids by incompatibility in *Pseudomonas aeruginosa* // Antimicrob. Agents Chemother. 1976. V. 10. P. 573–578.
14. Esikova T.Z., Ponamoreva O.N., Baskunov B.P. et al. Transformation of low-molecular linear caprolactam oligomers by caprolactam-degrading bacteria // J. Chem. Technol. Biotechnol. 2012. V. 87. № 3. P. 1284–1290.
<https://doi.org/10.1134/S0026261710030070>
15. Dunn N.W., Gunsalus I.C. Transmissible plasmids coding early enzymes of naphthalene oxidation in *Pseudomonas putida* // J. Bacteriol. 1973. V. 114. P. 974–997.

Inheritance of INCP-9 Catabolic Plasmids in *Pseudomonas* BacteriaT. Z. Esikova^a, T. O. Anokhina^a, L. I. Akhmetov^{a,*}, I. A. Kosheleva^a, and A. M. Boronin^a^aPushchinsky Scientific Centre of Biological Research, Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia

*e-mail: lenarakhmetov@yandex.ru

This work investigated the capability of the conjugative transfer of *epsilon*-caprolactam biodegradation (CAP) plasmids, belonging to incompatibility (Inc) groups P-2, P-7, P-9, and IncP-9 naphthalene biodegradation (NAH) plasmids to various species of *Pseudomonas* bacteria, including strains of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR), and the character of plasmid inheritance in these strains. The frequency of the conjugative transfer of all CAP and NAH plasmids (irrespective of their Inc groups) into *Pseudomonas* PGPR was shown to be lower than that into *P. putida* soil strains by more than an order of magnitude. The low frequency of conjugative transfer was found not to be caused by secretion of antibioticly active metabolites by *Pseudomonas* PGPR strains. Stability of inheritance of catabolic plasmids under nonselective conditions was established to depend on their Inc group and bacterial host strain. Thus, all investigated plasmids were stably maintained in *P. putida* KT2442 and BS394 strains for at least 100 generations. However, only CAP plasmids of IncP-2 and IncP-7 groups were stably maintained in *Pseudomonas* PGPR cells. CAP and NAH plasmids of different IncP-9 subgroups were eliminated from cells of rhizosphere pseudomonads within several generations. Thus, the work first revealed inheritance features of IncP-9 catabolic plasmids in *Pseudomonas* PGPR cells.

Keywords: *Pseudomonas* PGPR, biodegradation plasmids, incompatibility groups, plasmid inheritance.