

УДК 57.083.18

Л. Н. ВАЛЕНТОВИЧ, С. К. ЛОЗЮК, член-корреспондент Э. И. КОЛОМИЕЦ, М. А. ТИТОК

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИ
ЗНАЧИМЫХ БАКТЕРИЙ РОДА *BACILLUS***

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск

Поступило 25.11.2013

Введение. Повсеместно распространенные в природной среде бактерии рода *Bacillus*, способные продуцировать во внешнюю среду широкий спектр биологически активных соединений, являются перспективными объектами биотехнологии. В частности, они используются при производстве ферментов, а также входят в состав пробиотиков и биологических препаратов, обеспечивающих защиту животных и растений от вредителей и болезней [1–3]. Установление точной таксономической принадлежности биотехнологически значимых бактерий является необходимым этапом, позволяющим не только прогнозировать наличие в их геноме практически важных генетических детерминант, но и обеспечивает их последующее детальное изучение. Кроме того, знание особенностей генетической организации является основой для целенаправленного конструирования генно-модифицированных штаммов и микробных консорциумов, сочетающих ряд полезных свойств. Следует отметить, что наиболее широко применяемый в настоящее время метод молекулярно-генетической идентификации, основанный на сиквенс-анализе генов 16S рибосомной РНК (25665 последовательностей генов 16S рРНК представлено в доступных базах данных), имеет ряд ограничений. В частности, ряд видов, таких как *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus pumilis*, *Bacillus polyfermenticus* имеют высокое сходство нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК (гомология составляет 99–100 %), что не позволяет достоверно установить их видовой статус и, следовательно, затрудняет детальное изучение их геномов. Помимо этого, многие виды рода *Bacillus* представлены рядом подвидов, идентификация которых вызывает еще большие сложности в силу их генетического сходства.

Цель работы – молекулярно-генетическая идентификация биотехнологически значимых бактерий рода *Bacillus* на основании сиквенс-анализа случайных фрагментов хромосомной ДНК.

Материалы и методы исследований. В работе использовали 4 штамма бактерий (334, 262, 17, 245), отнесенные к виду *Bacillus subtilis* на основании физиолого-биохимического и сиквенс-анализа генов 16S рРНК, а также классический штамм *E. coli* XL1-Blue, предназначенный для молекулярного клонирования [4]. В качестве вектора для встраивания случайных фрагментов бактериальной хромосомы использовали плазмиду рMTL21C [5].

Бактерии выращивали в среде LB [6]. Агаризованные среды содержали 1,5 % агара. В работе использовали коммерческий препарат антибиотика ампициллина в концентрации 100 мкг/мл. Изопропилтио-β-D-галактозид (IPTG) и 5-бромо-4-хлоро-3-индоил-β-D-галактопиранозид (X-Gal) производства Thermo Scientific (Литва) готовили в соответствии с рекомендациями фирмы-изготовителя и использовали в концентрации 0,5 мМоль/л и 50 мкг/мл соответственно.

Хромосомную ДНК выделяли из бактерий с использованием СТАВ-буфера [7].

Плазмидную ДНК выделяли с использованием набора реактивов Plasmid Miniprep Kit Thermo Scientific (Литва).

Трансформацию *E. coli* плазмидной ДНК осуществляли методом электропорации с использованием прибора MicroPulser BIO-RAD (США) и кюветы с расстоянием между электродами 2 мм при напряжении 2,5 кВ в течение 5 мсек.

Рестриктию ферментами HindIII, PstI и лигирование ДНК осуществляли в условиях, рекомендуемых фирмой-изготовителем Thermo Scientific (Литва). Размер фрагментов ДНК устанавливали на основании их электрофоретической подвижности в агарозном геле, в качестве реперной ДНК использовали 1 kb DNA Ladder Invitrogen (США).

Для секвенирующей реакции использовали набор реактивов Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit (USB, Affymetrix, США) и меченые Cy5.5-меткой праймеры M13 («Праймтех», Беларусь). Сиквенс осуществляли с помощью автоматического секвенатора 4300 DNA Analyzer Li-COR Biosciences (США). Результаты анализировали с использованием компьютерных программ BLASTN2.2.1 (NCBI сайт: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), программного пакета eSeq V.3.1. (Li-COR Biosciences).

Результаты и их обсуждение. Бактерии рода *Bacillus* распространены повсеместно и занимают абсолютно разные экологические ниши (вода, воздух, почва, растительные и животные организмы). Такая поистине «неразборчивость» в местах обитания, в первую очередь, связана с их устойчивостью к стрессовым факторам среды благодаря способности образовывать споры. Однако спорообразование, как способ противостояния неблагоприятным внешним условиям, не является единственной причиной, обеспечивающей широкое распространение данных микроорганизмов в природе. Специфические условия существования, безусловно, накладывают отпечаток на их клеточный метаболизм, который в свою очередь определяется особенностями генетической организации. Утрата «старых» генов (функций) и появление «новых» приводит к дивергенции и образованию новых таксономических групп. Обладая генетическим родством, бактерии рода *Bacillus* характеризуются большим разнообразием признаков и свойств, что свидетельствует об их высоком потенциале изменчивости. В настоящее время установлены генетические локусы, подверженные высокой вариабельности, что выражается в изменении фенотипических и биохимических признаков у представителей даже одной таксономической группы. В частности, большим разнообразием характеризуются генетические детерминанты, обеспечивающие синтез вторичных метаболитов, тейховых кислот, белков, исправляющих нарушения в молекулах ДНК, участвующих в утилизации источников углерода, метаболизме аминокислот, а также поверхностных структур клетки, реагирующих на изменения в окружающей среде [8; 9].

Благодаря своей практической значимости бактерии рода *Bacillus* интенсивно изучаются. В настоящее время базы данных содержат информацию о нуклеотидных последовательностях почти 4500 бактериальных геномов, среди которых более 50 относятся к бактериям рода *Bacillus*. Наличие такого объема доступной информации позволяет сравнивать отдельные генетические детерминанты вновь выделенных штаммов с известными. При этом такого рода анализ не требует больших временных и материальных затрат.

В ходе выполнения настоящей работы были определены нуклеотидные последовательности отдельных фрагментов бактериальной хромосомы четырех практически значимых штаммов (используются в качестве основы биопрепаратов для сельского хозяйства), которые ранее на основании физиолого-биохимического и сиквенс-анализа генов 16S рРНК были отнесены к виду *B. subtilis*. Клонирование фрагментов HindIII-PstI бактериальной хромосомы бактерий штаммов 17 и 245 размером от 1,4 до 5,3 т. п. н. в составе вектора рMTL21C с последующим секвенированием вставок с использованием стандартных праймеров M13, позволило установить нуклеотидные последовательности 10 генетических детерминант, определяющих синтез гипотетических полипептидов или белков с известными функциями (табл. 1).

Сравнительный анализ показал, что исследованные последовательности ДНК проявляют высокую степень гомологии (98–99 %) с генами бактерий вида *Bacillus amyloliquefaciens* подвида *plantarum* и менее сходны с соответствующими детерминантами *Bacillus amyloliquefaciens* подвида *amyloliquefaciens* (гомология составляла 90–96 %). Исключение составила лишь одна нуклеотидная последовательность, проявлявшая 99 % сходства с генами обоих подвидов *B. amyloliquefaciens*, определяющая синтез рибосомного белка (табл. 1).

Следует отметить, что выделение двух подвидов в пределах одного вида *amyloliquefaciens* осуществлено относительно недавно и основано на сравнении полноразмерных геномов двух штаммов DSM7 и FZB42 [10]. Показано, что исследованные бактерии отличаются не только ну-

Таблица 1. Сиквенс-анализ фрагментов бактериальной хромосомы штаммов 17 и 245

Секвенированная ДНК (п. н.)	Гомология с известными генами, детерминирующими белки	Идентичность (%)	Видовая принадлежность
Штамм 17			
779	Белок, транспортирующий глицин и бетаин	99 (96**)	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> *
721	Гликозилтрансфераза	98 (92**)	–//–
817	Белок репарации	99 (94**)	–//–
834	Адениндеаминаза	99 (94**)	–//–
796	N-ацетилглюкозаминидаза	98 (92**)	–//–
Штамм 245			
624	Белок, осуществляющий котранспорт ионов Na(+) и глюкозы	99 (93**)	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> *
630	Гипотетический белок	98 (94**)	–//–
620	Гипотетический белок	99 (95**)	–//–
545	Гипотетический белок	98 (90**)	–//–
339	50S рибосомный белок	99 (99**)	–//–

Примечания: * – приведены значения идентичности секвенированных фрагментов ДНК с генетическими детерминантами *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* штаммов FZB42 (Ac. CP000560), AS43.3 (Ac. CP003838), NAU-B3 (Ac. HG514499), CAU B946 (Ac. HE617159), YAU B9601-Y2 (Ac. HE774679); ** – в скобках приведены значения идентичности секвенированных фрагментов ДНК с генетическими детерминантами *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* штаммов DSM7 (Ac. FN597644), TA208 (Ac. CP002627), LL3 (Ac. CP002634), XH7 (Ac. CP002927).

клеотидными последовательностями отдельных генов, но и рядом других свойств. В частности, установлено, что характерной особенностью представителей подвида *plantarum* является их способность колонизировать корни растений, а также продуцировать специфические вторичные метаболиты. Например, только представители подвида *plantarum* характеризуются способностью синтезировать поликетидные антибиотики макролактин и диффицидин. Кроме того, для представителей подвида *amyloliquefaciens* не идентифицирован фенгицин, являющийся антифунгальным соединением липопротеиновой природы, достаточно широко распространенным среди бактерий рода *Bacillus* [11]. Оказалось, что в хромосоме бактерий подвида *amyloliquefaciens* генетический локус, определяющий синтез этого антифунгального соединения, представлен лишь частично [10].

Таким образом, на основании полученных результатов с высокой вероятностью можно утверждать, что бактерии исследованных штаммов 17 и 245 относятся к бактериям *Bacillus amyloliquefaciens* подвида *plantarum*, что обуславливает дальнейшее направленное изучение практически важных свойств данных микроорганизмов исходя из их таксономической принадлежности.

Не менее интересными оказались результаты сиквенса случайных нуклеотидных последовательностей хромосомы бактерий штаммов 262 и 334. Так же как и в предыдущем случае в состав вектора рMTL21C были клонированы фрагменты HindIII-PstI, полученные в результате обработки тотальной ДНК вышеуказанными ферментами рестрикции (размер вставок составлял 1,4–5,2 т. п. н.). Анализ секвенированных последовательностей выявил их сходство с хромосомными детерминантами бактерий *Bacillus subtilis* (табл. 2).

Казалось бы, в полученных результатах нет ничего неожиданного, поскольку на основании физиолого-биохимического и сиквенс-анализа 16S рРНК они были отнесены к виду *B. subtilis*. Однако более пристальный анализ позволил установить их таксономический статус на уровне подвида. Оказалось, что исследованные последовательности проявляют 99–100 % гомологии с генами бактерий *Bacillus subtilis* подвида *subtilis*, тогда как с аналогичными детерминантами подвида *spizizenii* гомология была достоверно ниже и не превышала 90–95 %. Исключение составили гены, детерминирующие рибосомный белок S20 и S-аденозилметеониндекарбоксилазу, сходство которых с аналогичными последовательностями ДНК обоих подвигов составило 97–99 % (табл. 2).

Т а б л и ц а 2. Сиквенс-анализ фрагментов бактериальной хромосомы штаммов 334 и 262

Секвенированная ДНК (п. н.)	Гомология с известными генами, детерминирующими белки	Идентичность (%)	Видовая принадлежность
Штамм 334			
433	Рибосомный белок S20	100 (97**)	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> *
878	Сурфактинсинтетаза	98 (92**)	–// –
654	Бета-гидроксиациддегидрогеназа	99 (93**)	–// –
886	Белок, транспортирующий марганец	99 (95**)	–// –
790	Пируватоксидаза	98 (90**)	–// –
Штамм 262			
745	АТФ-зависимая протеаза	99 (95**)	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>
853	Регулятор ответа двухкомпонентной системы	98 (90**)	–// –
819	Белок инициации репликации, связанный с мембраной	99 (95**)	–// –
638	S-аденозилметеониндекарбоксилаза	99 (99**)	–// –
758	Пермеаза семейства ABC транспортеров	99*** (90**)	*

П р и м е ч а н и я: * – приведены значения идентичности секвенированных фрагментов ДНК с генетическими детерминантами *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* штаммов ВАВ-1 (Ас. СР004405), RO-NN-1 (Ас. СР002906), 6051-HGW (Ас. СР003329), BSP1 (Ас. СР003695), 168 (AL009126); ** – в скобках приведены значения идентичности секвенированных фрагментов ДНК с генетическими детерминантами *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* штаммов W23 (Ас. СР002183), TU-B-10 (Ас. СР002905); *** – для гена, детерминирующего пермеазу семейства ABC транспортеров, приведено значение гомологии с аналогичным геном бактерий *B. subtilis* BSn5, при этом сходство с аналогичным геном бактерий *B. subtilis* subsp. *subtilis* 168 составило 96 %.

Как указывалось ранее, особенностями генетической организации у разных подвидов и даже штаммов характеризуются системы, обеспечивающие взаимодействие бактерий с внешней средой [9]. Среди них, безусловно, не последнюю роль играют белки транспорта, обеспечивающие введение и выведение из клетки определенных типов соединений [8]. В этом плане хотелось бы отметить, что для штамма 262 ген, детерминирующий синтез пермеазы эффлюкс системы ABC, проявлял наибольшее сходство с аналогичным геном штамма *B. subtilis* BSn5, тогда как с типовыми штаммами *B. subtilis* подвида *subtilis* сходство не превышало 96 %, а с представителями *B. subtilis* подвида *spizizenii* составило только 90 %. В связи с этим хотелось бы отметить некоторые особенности бактерий штамма *B. subtilis* BSn5. Данные эндофитные микроорганизмы (выделены из тканей растения *Amorphophallus konjac*) способны продуцировать специфическое белковое соединение, подавляющее рост и развитие патогенных бактерий *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, вызывающих мягкие гнили корней многих растений. Для бактерий *B. subtilis* BSn5 определена нуклеотидная последовательность всего генома, что позволило сравнить ее организацию с типовым штаммом *B. subtilis* subsp. *subtilis* 168. Оказалось, что геном *B. subtilis* BSn5 отличается от типового штамма 168 наличием небольших вставок и делеций размером около 5 т. п. н. Изменения затрагивают ряд функций, связанных с регуляцией споруляции, синтезом клеточной стенки, антибиотиков, ферментами рестрикции-модификации, эффлюкс-системой и некоторые другие свойства. Более 4,8 % генома бактерий *B. subtilis* BSn5 вовлечены в синтез антибиотиков, причем некоторые из выявленных детерминант, обеспечивающих синтез практически ценных вторичных метаболитов, отсутствуют в геноме типового штамма *B. subtilis* 168 (например, локусы BSn5_04295–BSn5_04355, вовлеченные в синтез антимикробных соединений гибридной природы, а также ген BSn5_12550, определяющий синтез субланцина). В то же время специфические генетические кластеры, детерминирующие синтез лантибиотика паенибациллина и участвующие в регуляции споруляции, отсутствуют в хромосоме эндофитных бактерий штамма *B. subtilis* BSn5 [12].

Заключение. Таким образом, в результате сиквенс-анализа хромосомных последовательностей штаммов 334 и 262 было установлено, что они относятся к виду *Bacillus subtilis* подвида *subtilis*. Высокая гомология гена, определяющего синтез пермеазы семейства ABC транспорте-

ров, бактерий штамма 262 с аналогичной детерминантой штамма *B. subtilis* BSn5 может указывать на некоторые особенности его генетической организации.

Следует отметить, что в ходе выполнения настоящей работы получены результаты, которые обосновывают возможность идентификации бактерий рода *Bacillus* с использованием простого методического приема, предполагающего секвенирование случайных фрагментов бактериальной хромосомы. По сути, предложенный методический подход является одним из разновидностей широко используемого филогенетического анализа, предполагающего определение нуклеотидных последовательностей отдельных генетических детерминант, среди которых наиболее часто анализируются гены, детерминирующие синтез субъединиц гиразы (*gyrA*), РНК-полимеразы (*rpoB*), ДНК-полимеразы (*polC*), белка теплового шока (*groEL*), 16S рРНК и некоторые другие [13]. Однако в отличие от известных приемов, он не требует проведения полимеразной цепной реакции с использованием специфических праймеров, что в определенной степени удешевляет и ускоряет процедуру идентификации.

Литература

1. Schallmey M., Singh A., Ward O. P. // Can. J. Microbiol. 2004. Vol. 50, N 1. P. 1–17.
2. Berg G. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2009. Vol. 84. P. 11–18.
3. Cruz P. M., Ibáñez A. L., Hermosillo O. A. M., Saad H. C. R. // ISRN Microbiol. 2012. Vol. 2012. P. 916845–916860.
4. Bullock W. O., Fernandez J. M., Short J. M. // Biotechniques. 1987. Vol. 5. P. 376–380.
5. Chambers S. P., Prior S. E., Barstow D. A., Minton N. P. // Gene. 1988. Vol. 68, N 1. P. 139–149.
6. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. М., 1976. – 436 с.
7. Wilson K. Current Protocols in Molecular Biology. 1997. – 5300 p.
8. Earl A. M., Losick R., Kolter R. // J. Bacteriol. 2007. Vol. 89, N 3. P. 1163–1170.
9. Earl A. M., Losick R., Kolter R. // Trends Microbiol. 2008. Vol. 16, N 6. P. 269.
10. Borriss R., Chen X-H., Rueckert C. et al. // Intern. J. of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2011. Vol. 61. P. 1786–1801.
11. Ramarathnam R., Bo S., Chen Y. et al. // Can. J. Microbiol. 2007. Vol. 53, N 7. P. 901–911.
12. Deng Y., Zhu Y., Wang P. et al. // J. Bacteriol. 2011. Vol. 193, N 8. P. 2070–2071.
13. Rooney A. P., Price N. P. J., Ehrhardt C. et al. // Intern. J. of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2009. Vol. 59. P. 2429–2436.

L. N. VALENTOVICH, S. K. LAZIUK, E. I. KOLOMIETS, M. A. TITOK

titok@bsu.by

MOLECULAR-GENETIC IDENTIFICATION OF BIOTECHNOLOGICALLY RELEVANT BACTERIA OF THE GENUS *BACILLUS*

Summary

We have proposed an original approach for precise identification of bacteria of the genus *Bacillus*. Random fragment sequencing of bacterial chromosome DNA allowed us to establish a taxonomic membership for four studied microorganisms at the subspecies level (*Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* and *B. subtilis* subsp. *subtilis*).