

ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ СПОРООБРАЗУЮЩИХ БАКТЕРИЙ ВИДОВ *BACILLUS SUBTILIS* И *BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВИДОСПЕЦИФИЧЕСКИХ ПРАЙМЕРОВ

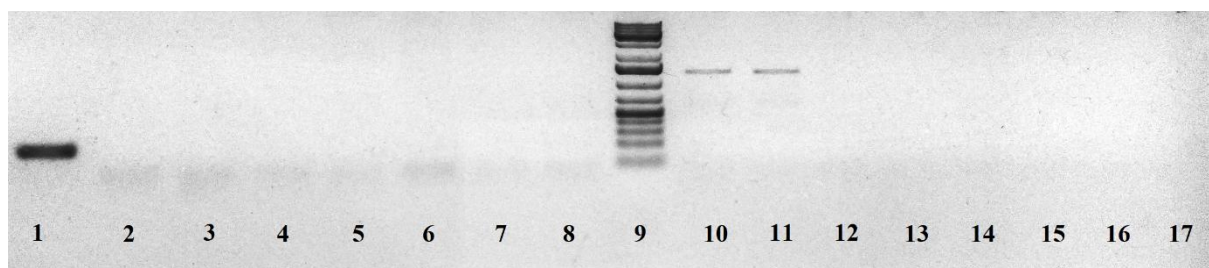
Леонович С.И., Новик Г.И.

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск,
mnemozina176@gmail.com

Род *Bacillus* (Cohn, 1872) представлен грамположительными, в основном подвижными, спорообразующими палочкообразными бактериями [3]. Представители данного рода используются в промышленности как продуценты ферментов – протеаз, амилаз и целлюлаз. В частности, наиболее ценной для биотехнологической промышленности является группа бактерий *B. subtilis* (*B. subtilis* group (BSG)), состоящая из более 10 видов тесно связанных таксонов, используемых в получении биологически активных добавок для кормления животных и птицы [2, 4]. К данной группе *B. subtilis* относятся такие виды бактерий как *B. subtilis* subsp. *subtilis* (Smith et al. 1964; Nakamura et al. 1999), *Bacillus licheniformis* (Skerman et al. 1980), *B. amyloliquefaciens* (Priest et al. 1987), *Bacillus atrophaeus* (Nakamura 1989), *Bacillus mojavensis* (Roberts et al. 1994), *Bacillus vallismortis* (Robert et al. 1996), *B. subtilis* subsp. *spizizenii* (Nakamura et al. 1999) [1]. В связи с высокой биотехнологической значимостью спорообразующих бактерий актуальной проблемой является постановка точного таксономического диагноза для промышленно-ценных штаммов продуцентов биологически активных веществ. На сегодняшний день, одним из широко используемых генетических методов идентификации бактерий является сравнение последовательностей 16S рРНК [5]. Многочисленные виды рода *Bacillus*, описанные до настоящего времени, демонстрируют довольно консервативные последовательности 16S рРНК по сравнению с другими родами. Однако данный метод является не всегда приемлемым для дифференциации представителей *Bacillus* 16S рРНК группы 1 (*Bacillus* 16S rRNA group 1), включая вид *B. subtilis*, демонстрирующий 99,3% идентичности на уровне гена 16S рРНК с видом *B. atrophaeus* и 98,3% с видами *B. licheniformis* и *B. amyloliquefaciens* [1].

В нашей работе, для ПЦР анализа с видоспецифическими праймерами видов *Bacillus subtilis* и *Bacillus amyloliquefaciens* выбраны 44 штамма бактерий из фонда Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов, депонированных в коллекции как представители вида *Bacillus subtilis*. Использовались две пары праймеров: пара EN1F и EN2F, амплифицирующих участок эндо-β-1,4-глюканазы видов *Bacillus subtilis*, и дающих ампликон размеров 1311 п.н. [1] и пара 171F1 и 353R1, амплифицирующих участок pheS гена (ген фенилаланин tRNA лигазы альфа субъединицы) видов *Bacillus amyloliquefaciens*, и дающих ампликон размеров 202 п.н. [2]. Ген эндо-β-1,4-

глюканазы *B. subtilis* на 93% идентичен с генами *B. amyloliquefaciens*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus* и *B. licheniformis* и на 90% идентичен с последовательностью гена *B. subtilis* subsp. *spizizenii* [1]. PheS ген, кодирующий фенилаланин-тРНК синтазу, имеет средние значения в 94,7% схожести последовательностей среди штаммов BSG [2]. Специфичность взятых праймеров была проверена с помощью сервера NCBI Primer Blast и базы данных GenBank. Праймеры EN1F и EN2F амплифицируют участок гена эндо- β -1,4-глюканазы видов *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* и *Bacillus velezensis* на матрице ДНК. Праймеры 171F1 и 353R1 амплифицируют участок pheS гена видов *Bacillus amyloliquefaciens* и *Bacillus velezensis*. В качестве контроля проведена ПЦР с культурами бактерий, выделенными и идентифицированными в Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов с помощью сравнительного анализа гомологии секвенированной нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК и референтных последовательностей базы данных Ribosomal Database Project (RDP). В качестве отрицательного контроля выступали представители *B. subtilis* group: *Bacillus mojavensis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus vallismortis* и бактерии видов *Bacillus aryabhatai*, *Bacillus aerophilus* и *Bacillus cisiae*. В качестве положительного контроля выступали бактерии анализируемых видов *Bacillus subtilis* и *Bacillus amyloliquefaciens* (рис. 1).



1-8 – Продукты ПЦР с праймерами 171F1/353R1 образцов геномной ДНК бактерий видов: 1- *Bacillus amyloliquefaciens*, 2- *Bacillus subtilis*, 3- *Bacillus cisiae*; 4- *Bacillus aerophilus*, 5- *Bacillus aryabhatai*, 6- *Bacillus vallismortis*, 7- *Bacillus licheniformis*, 8- *Bacillus mojavensis*;
 9 – Маркерная ДНК (Thermo Scientific O'GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder, ready-to-use);
 10 -17 – Продукты ПЦР с праймерами EN1F/EN2F образцов геномной ДНК бактерий видов: 10- *Bacillus amyloliquefaciens*, 11- *Bacillus subtilis*, 12- *Bacillus cisiae*; 13- *Bacillus aerophilus*, 14- *Bacillus aryabhatai*, 15- *Bacillus vallismortis*, 16- *Bacillus licheniformis*, 17- *Bacillus mojavensis*;

Рисунок 1 – Электрофореграмма продуктов ПЦР с видоспецифическими праймерами 171F1/353R1 и EN1F/EN2F

По результатам ПЦР анализа 44 штаммов *Bacillus subtilis* для 30 штаммов получены продукты амплификации двумя парами праймеров (171F1-353R1 и

EN1F-EN1R). Для 14 штаммов бактерий ПЦР-продукты получены только при использовании пары праймеров EN1F и EN1R. Исходя из результатов серии экспериментов установлено, что среди анализируемых 44 штаммов, изначально отнесенных к виду *Bacillus subtilis*, верно идентифицированы только 14 штаммов бактерий. При этом 30 штаммов бактерий реиндефицированы нами как представители вида *Bacillus amyloliquefaciens*. Используемый нами метод может быть рекомендован для экспресс-идентификации и дифференциации биотехнологически значимых видов спорообразующих бактерий *Bacillus subtilis* и *Bacillus amyloliquefaciens*.

Литература

1. Ashe S., Maji U. J., Sen R., Mohanty S., Maiti N. K. Specific oligonucleotide primers for detection of endoglucanase positive *Bacillus subtilis* by PCR // 3 Biotech. 2014. Vol. 4. P. 461–465.
2. Huang C., Huang L., Chang M., Wu C. Use of novel specific primers targeted to *pheS* and *tuf* gene for species and subspecies identification and differentiation of the *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus licheniformis* // African Journal of Microbiology Research. 2017. Vol.11. No7. P.264-270.
3. Siciua O.A., Florica C., Cornea C.P. Biodiversity of *Bacillus subtilis* group and beneficial traits of *Bacillus* species useful in plant protection // Romanian Biotechnological Letters. 2015. Vol.20. No.5. P10737–10750.
4. Sorokulova I. Modern Status and Perspectives of *Bacillus* Bacteria as Probiotics // J Prob Health. 2013. Vol.1. Issue.4. p. 5.
5. Stackebrandt E., Ebers J. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards // Microbiol. Today. 2006. Vol. 33. P. 152-155.