

Л.А. Сафронова¹, Л.Б. Зеленая¹, В.В. Ключко¹, Л.В. Авдеева¹, О.Н. Рева²
В.С. Подгорский¹

¹ Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного 154, Киев ГСП, Д 03680, Украина

² University of Pretoria, Department of Biochemistry, Bioinformatics and Computational Biology Unit,
Pretoria, South Africa

ГЕНО- И ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ БАЦИЛЛ – КОМПОНЕНТОВ ЭНДОСПОРИНА

Пробиотик Эндоспорин используется в ветеринарии для профилактики и лечения дисбактериозов, кишечных инфекций, гнойных ран и послеродовых эндометритов у сельскохозяйственных животных. В состав пробиотика входят два штамма бактерий рода *Bacillus*, которые проявляют выраженный антагонизм в отношении широкого спектра патогенных микроорганизмов, характеризуются протеазной активностью, а также выделяют в питательную среду комплекс бактерио- и дрожжепитетических ферментов и полисахаридов. По спектру биологической активности культуры дополняют друг друга. Для уточнения видовой принадлежности этих штаммов были определены последовательности гена 16S рРНК и изучен жирнокислотный состав клеточной стенки. Установлено, что штаммы принадлежат к виду *B. velezensis*. В статье дискутируются недостатки идентификации родственных видов по гену 16S рРНК и предложен метод составления профилей полиморфных нуклеотидов. Показано, что перспективность использования культур в пробиотиках определяется не видовыми, а уникальными штаммовыми характеристиками культур.

Ключевые слова: *Bacillus*, 16S рРНК, пробиотик, эндоспорин, антагонистическая активность, биологически активные вещества.

Пробиотики – препараты из живых микробных культур, характеризующиеся выраженными антимикробными и иммуномодулирующими свойствами, высокой клинической эффективностью и безопасностью для макроорганизма и окружающей среды. В состав большинства известных пробиотиков входят представители облигатной микрофлоры кишечника – молочнокислые бактерии. Однако все большее распространение получают биопрепараты на основе аэробных спорообразующих бактерий рода *Bacillus* (бактисубтил, споробактерин, биоспорин, субалин и др.), которые являются транзитными представителями кишечного микробиоценоза и характеризуются широким спектром биологической активности [7, 12, 22].

Учитывая присутствие на фармацевтическом рынке большого количества разнообразных нестандартизированных пробиотических препаратов, разработаны международные рекомендации для оценки пробиотических штаммов и функциональных продуктов на их основе [14]. Согласно данному документу, одним из основных требований к активным штаммам микроорганизмов является проведение их четкой идентификации (фенотипической и генотипической).

В Институте микробиологии и вирусологии НАНУ (ИМВ) разработан бациллярный пробиотик эндоспорин, предназначенный для профилактики и лечения дисбактериозов, кишечных инфекций, гнойных ран и послеродовых эндометритов у сельскохозяйственных животных [6,7]. Ранее изученные в соответствии с методическими рекомендациями, разработанными в ИМВ [8,18], фенотипические свойства двух штаммов под коллекционными номерами 39 и 51, входящие в состав препарата, позволили отнести их к виду *Bacillus subtilis*. Однако биологические особенности штаммов 39 и 51 ставят под сомнение точность их идентификации по фенотипу.

Задачей нашего исследования явилось дальнейшее изучение фенотипической и генотипической характеристики пробиотических штаммов *Bacillus* sp. 39 и 51.

Сложность в определении бактерий рода *Bacillus* состоит в отсутствии четких отличий между видами по фенотипу. С помощью современных генетических методов исследований было установлено, что вид *B. subtilis* в действительности является совокупностью близкородственных видов и подвидов. К этой группе микроорганизмов относят виды *B. amyloliquefaciens* (недавно подразделен на два подвида *B. amyloliquefaciens* ssp. *amyloliquefaciens* и *B. amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* [9], *B. atrophaeus*, *B. axarquiensis*, *B. malacitensis*, *B. mojavensis*, *B. vallismortis* и *B. velezensis*. Сам вид *B. subtilis* был подразделен на два подвида *B. subtilis* ssp. *subtilis* и

B. subtilis ssp. *spizizenii* [10]. Свойства микроорганизмов, необходимые для их успешного использования в биотехнологии, могут быть обусловлены как видовой принадлежностью штамма, так и уникальными особенностями данной культуры. Чтобы разобраться в этих вопросах, чрезвычайно важно правильно провести идентификацию вновь выделенных природных изолятов и музейных культур. В наше время парадигмой видовой идентификации является анализ нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК, но даже этот подход не гарантирует надежной идентификации по ряду причин. Во-первых, отличия между родственными видами и подвидами микроорганизмов затрагивают не более 1–3 % от общего числа нуклеотидов гена 16S рРНК (1489 п.н. у *B. subtilis* и родственных видов). Во-вторых, для видов группы *B. subtilis* характерно наличие в геноме нескольких аллелей гена 16S рРНК (по 10 аллелей у полностью секвенированных штаммов *B. subtilis* 168 и *B. amyloliquefaciens* FZB42), причем отличия между аллелями в геноме одного штамма могут быть соизмеримы с межвидовыми различиями. Кроме того, сам процесс секвенирования недостаточно надежен и, в случае сравнения близкородственных микроорганизмов, число ошибок секвенирования может быть соизмеримым с числом реально отличающихся пар нуклеотидов.

Материалы и методы. Объектами исследований служили штаммы *Bacillus* sp. 39 и 51, на основе которых создан эффективный лечебно-профилактический пробиотик эндоспорин. Данные культуры депонированы в коллекции микроорганизмов Института микробиологии и вирусологии НАН Украины под номерами УКМ В-5139 и УКМ В-5140 соответственно.

Антагонистическую активность штаммов определяли методом отсроченного антагонизма. Экзополисахариды (ЭПС) определяли весовым методом после отделения клеток от культуральной жидкости и осаждения этанолом [2]. Литическую активность исследуемых штаммов бактерий определяли турбидиметрическим методом [5].

Прирост биомассы клеток бактерий оценивали в единицах оптической плотности, регистрируемой на КФК-2 при 540 нм и по весу сухих клеток, определяемому после высушивания до постоянной массы при 100°C. Титр жизнеспособных клеток определяли путем высева серийных разведений клеточной суспензии на МПА.

Для выращивания бактерий применяли глубинный способ культивирования на глюкозо-минеральной питательной среде [5].

Протеазную активность штаммов изучали на твердой среде с эластином, казеином и желатином [8].

Для исследования процесса усвоения источников углерода культурами использовали стандартизированные системы API 50 СНВ/Е (Biomerieux, Франция).

Бактериальную ДНК выделяли из суточной клеточной культуры с помощью набора “ДНК-сорб В” (“АмплиСенс”, Россия). Амплификацию гена 16S рРНК проводили с праймерами 27f и 1492r, согласно стандартному протоколу [17]. Очищенный ПЦР-продукт сиквенировали в двух направлениях с использованием тех же праймеров на приборе ABI 310 (Applied Biosystems). Контроль качества сиквенирования и выравнивание противонаправленных последовательностей ДНК выполняли с использованием пакета программ Staden Package [21]. Полученные сиквенсы 16S рРНК штаммов 39 и 51 были депонированы в базе данных GenBank под номерами JF346868 и JF346869 соответственно. Для выравнивания последовательностей ДНК использовали алгоритм ClustalW, реализованный в программе BioEdit. Для филогенетического анализа использовали программы *pars.exe* пакета Phylip и MEGA 4 [23]. Сиквенсы гена 16S рРНК типовых культур бактерий рода *Bacillus* получили из баз данных GenBank и MicrobesOnline (www.microbesonline.org).

Для установления полиморфных нуклеотидов в последовательностях генов 16S рРНК с помощью программы BioEdit Entropy Plot вычислялась энтропия изменчивости для каждой позиции в выровненных последовательностях ДНК. Полиморфными считались те позиции, в которых энтропия превышала значение 0,3. Затем для картирования полиморфных нуклеотидов в структуре рибосомальной РНК использовалась модель, предложенная в Web-ресурсе Comparative RNA Web Portal (www.rna.cccb.utexas.edu).

Жирнокислотный состав клеточных липидов (метиловых эфиров жирных кислот) изучали методом хромато-масс-спектрометрии, как было описано ранее [3]. Исследования проводили на хроматографе Agilent 6890N с масс-спектрометрическим детектором Agilent 5973 inert (капиллярная колонка HP-5MS (J&W Scientific, USA)). Газ-носитель – гелий; начальная темпера-

тура колонки – 150°C; конечная температура колонки – 250°C; температурный градиент – 4°C/мин; температура интерфейса – 280°C; тип ионизации – электронный удар; энергия ионизации – 70 eV.

Обработку данных хромато-масс-спектрометрического анализа проводили с помощью компьютерной программы ChemStation и интегрированной базы данных масс-спектров NIST 02, а также стандарта метиловых эфиров жирных кислот бактерий (Supelco, № 4708-U, USA). Опыты проводили в трех повторностях, определяя среднее содержание жирных кислот в клетках.

Результаты и их обсуждение. Штаммы бактерий *Bacillus* sp. 39 и 51 были отобраны нами ранее в качестве основы биопрепарата для лечения послеродовых гнойно-воспалительных процессов у сельскохозяйственных животных [6]. Дальнейшее изучение биологической активности пробиотических культур показало целесообразность расширения применения созданного эффективного биопрепарата [7]. В настоящее время разработана технология получения препарата в глубинных условиях культивирования и налажено его производство.

Исследованные культуры бацилл характеризуются выраженными антагонистическими свойствами в отношении широкого спектра микроорганизмов, выделенных из разных эконисш (табл. 1). Установлено, что штаммы *Bacillus* sp 39 и 51 дополняют друг друга как по спектру и степени антагонистического действия, так и по некоторым другим биологическим свойствам. Так, если штамм 39 оказывает выраженное ингибирующее действие на *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus morgani* и разные виды грибов, то у штамма 51 антагонистическая активность в отношении этих микроорганизмов проявляется слабо. При этом штамм 51 демонстрирует выраженную антагонистическую активность в отношении культур бактерий *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* sp., *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*, *Agrobacter tumefaciens*, *Clavibacter michiganensis* subs. *michiganensis*. Заслуживает внимания то, что вышеперечисленные виды бактерий очень редко оказываются чувствительными к антагонистическому действию аэробных бацилл (табл. 1).

Таблица 1

Спектр и степень антагонистической активности пробиотических штаммов

Тест-культуры	Активность штаммов (зона задержки роста тест-культур, мм)	
	Штамм 39	Штамм 51
<i>Staphylococcus aureus</i> 209	24±2	10±2
<i>S. aureus</i> K 13	25±2	11±1
<i>Escherichia coli</i> 070	20±1	11±1
<i>E. coli</i> K 125	16±2	8±2
<i>Proteus vulgaris</i> U-8	24±2	14±2
<i>P. morgani</i> K 92	21±2	10
<i>Shigella sonnei</i> 659	26±2	15±2
<i>Salmonella</i> sp. K 106	12±1	5±1
<i>S. typhi</i> 11	18±2	12±1
<i>Corynebacterium michiganense</i> 37	0	12±2
<i>Candida albicans</i> 690	27±2	9±2
<i>Acinetobacter</i> sp. K 73	3±1	12±2
<i>Pseudomonas</i> sp. K 16	8±2	16±3
<i>P. aeruginosa</i> 4141	0	11±2
<i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> 7070	7±2	22±3
<i>Moraxella</i> sp. K 3	0	11±1
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> 8628	9±2	23±3
<i>Clavibacter michiganensis</i> subs. <i>michiganensis</i> 7905	8±2	20±3
<i>Alternaria alternata</i> 2827	16±2	0
<i>Botrytis cinerea</i> 2836	16±2	5±2
<i>Trichotecium roseum</i> 2830	22±2	4±1
<i>Mycor mycedo</i> 2829	11±1	0
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> var. <i>gypseum</i> K	23±3	8±2

Другое фенотипическое отличие пробиотических культур состоит в том, что штамм 39, в отличие от штамма 51, синтезирует лизоцим, что может приводить к усилению его антагонистической активности. В настоящее время активно разрабатываются новые виды пробиотиков, включающие в себя генноинженерные штаммы *B.subtilis*, обладающие повышенным уровнем лизоцимообразования и антагонистической активностью против условно патогенных бактерий.

Считают, что механизм комплексного лечебного действия препаратов из живых микробных культур в большой степени обусловлен наличием у пробиотических штаммов целого ряда полезных для макроорганизма свойств, в частности способности к продукции разнообразных биологически активных соединений [22].

Показано, что штаммы обладают протеиназной активностью (эластазной, казеиназной и желатиназной). Протеазы часто используются в ветеринарной и медицинской практике для лечения воспалительных процессов, для очистки гнойных и некротических ран и ожогов, а также для растворения тромбов. Есть данные, что протеазы, образуемые пробиотическими штаммами, способны расщеплять эндотоксины патогенных бактерий [11]. Штаммы 39 и 51 также являются продуцентами полисахаридного комплекса. Наивысшая интенсивность синтеза полисахаридов совпадает с экспоненциальной фазой роста и по времени наступает уже к 6-му часу культивирования. В количественном отношении по продукции ЭПС выделяется штамм 39 (9,8 г/л против 8,2 г/л у штамма *Bacillus* sp. 51). Последующее выращивание не ведет к приросту ЭПС, хотя накопление биомассы продолжается вплоть до 18 часов. Таким образом, штаммы 39 и 51 обладают высокой активностью синтеза ЭПС в период интенсивных физиологических процессов, т.е. в лог-фазе роста. При переходе культур в стационарную фазу развития интенсивность синтеза ЭПС падает и становится практически равной нулю при отмирании клеток.

Известно, что полисахариды бактерий способны оказывать иммуномодулирующее действие на макроорганизм [4, 16]. Поэтому можно предположить, что полисахариды пробиотических бацилл в комплексе с другими биологически активными соединениями могут стимулировать защитные реакции организма, усиливая терапевтическую эффективность биопрепарата.

Бактерии рода *Bacillus* в процессе глубинного культивирования также интенсивно образуют и экскретируют в питательную среду комплекс бактерио- и дрожжелитических ферментов с разной степенью активности. Доказано, что антагонистическое действие бацилл осуществляется в том числе и за счет продукции литических ферментов [5, 22]. В большей степени они разрушают клетки грамотрицательных бактерий и дрожжей. Комплексная ферментная система штаммов 39 и 51 лизировала не только мертвые (прогретые), но и живые (интактные) клетки как грамположительных и грамотрицательных бактерий, так и дрожжей (табл. 2).

Таблица 2

Спектр действия литических ферментов штаммов 39 и 51

Тест-культура	Время инкубирования, мин	Степень лизиса, %		
		клетки живые	клетки прогретые (10 мин)	
			60°C	100°C
Штамм 39				
<i>E.coli</i>	60	7,5±0,8	18,6±1,1	41,9±0,5
	100	7,7±0,5	21,5±0,8	53,2±0,3
<i>S.aureus</i>	60	5,9±0,09	3,6±0,1	0
	100	8,5±0,1	8,5±0,3	1,5±0,5
<i>C.albicans</i>	60	20,5±0,7	21,5±0,5	18,6±0,2
	100	26,9±0,3	28,2±0,1	19,0±0,5
Штамм 51				
<i>E.coli</i>	60	18,3±0,2	23,1±0,1	48,3±1,2
	100	33,3±0,1	37,7±0,3	62,9±0,8
<i>S.aureus</i>	60	3,2±0,07	2,2±0,1	0
	100	7,7±0,3	5,9±0,4	1,6±0,7
<i>C.albicans</i>	60	9,4±0,3	11,3±0,5	10,0±0,1
	100	20,3±1,1	25,0±1,3	17,0±1,8

Длительность культивирования, соответствующая максимальному накоплению литической активности, составила для *Bacillus* sp. 39 – 24 ч, для *Bacillus* sp. 51 – 18 ч. К данному времени у исследованных культур заканчивался процесс спорообразования.

Для дополнительной идентификации пробиотических штаммов был исследован процесс усвоения ими 49 источников углерода разнообразного химического строения с использованием стандартизированной системы API 50 CHB/E (Biomerieux, Франция). Спектры углеродного питания исследуемых штаммов выявились идентичными и подтвердили их принадлежность к группе *B. subtilis* / *B. amyloliquefaciens*.

Полученные фрагменты ДНК штаммов *Bacillus* sp. 39 и 51 были объединены в полный сиквенс гена 16S рРНК с помощью программы Gap4 пакета Staden Package. Поиск похожих сиквенсов методом BLASTN в базе данных NCBI выявил полное совпадение (99 %) полученных последовательностей с геном 16S рРНК штамма *B. velezensis* C6-1. Филогенетические отношения штаммов 39 и 51 с типовыми представителями рода *Bacillus* установили путем сравнения сиквенсов 16S рРНК (рис. 1).

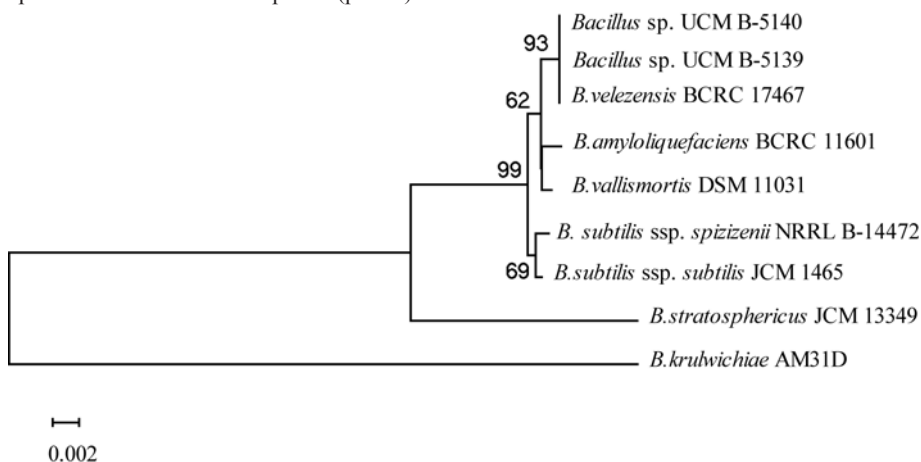


Рис. 1. Филогенетические отношения штаммов 39 и 51 с типовыми штаммами бактерий рода *Bacillus*, полученные сравнением последовательностей гена 16S рРНК. Дерево построено с использованием алгоритма ближайшего соседа. Цифрами показана частота группирования штаммов в кластеры в 100 репликах исходного набора последовательностей ДНК, случайно измененных методом boot-strap.

В данной работе для оптимизации идентификации бацилл по последовательностям гена 16S рРНК мы воспользовались данными о структуре этого гена у рода *Bacillus*, доступными в международной базе данных GenBank, с целью выявления «горячих» полиморфных нуклеотидов в структуре гена. Данный подход был предложен Goto et al. (2000) и успешно использован нами ранее для идентификации штаммов эндофитного экотипа вида *B. amyloliquefaciens* [13,19].

В результате сравнительного анализа последовательностей переменного фрагмента гена 16S рРНК нами были обнаружены 9 полиморфных нуклеотидов, по которым можно было отличить родственные виды и подвиды группы *B. subtilis*. Распределение полиморфных нуклеотидов в структуре рибосомальной РНК не было случайным. Полиморфными были либо пары нуклеотидов, которые в структуре молекулы образуют водородные связи, либо одиночные нуклеотиды в петлях молекулы (рис. 2). Обнаружение несовпадений нуклеотидов между штаммами группы *B. subtilis* в других позициях с высокой долей вероятности будет результатом ошибок секвенирования.

По полученным нуклеотидным последовательностям генов 16S рРНК у штаммов 39 и 51, а также по данным, доступным из базы данных GenBank, нами были построены профили полиморфных нуклеотидов для 33 штаммов бактерий рода *Bacillus*, родственных виду *B. subtilis* (табл. 3). В числе этих культур были музейные типовые штаммы видов *B. subtilis* подвидов *subtilis* и *spizizenii*, *B. amyloliquefaciens*, *B. atrophaeus*, *B. mojavensis*, *B. vallismortis* и *B. velezensis*, а также музейные штаммы из Украинской коллекции микроорганизмов, ви-

довая принадлежность которых была установлена ранее [19]. Для сравнительной характеристики последовательностей нуклеотидов нами также были рассмотрены все аллели гена 16S рРНК, представленные в геномах *B. subtilis* ssp. *subtilis* 168, *B. subtilis* ssp. *spizizenii* ATCC 6633, *B. amyloliquefaciens* ssp. *amyloliquefaciens* DSM 7^T и *B. amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* FZB42, доступные для анализа в базе данных GenBank.

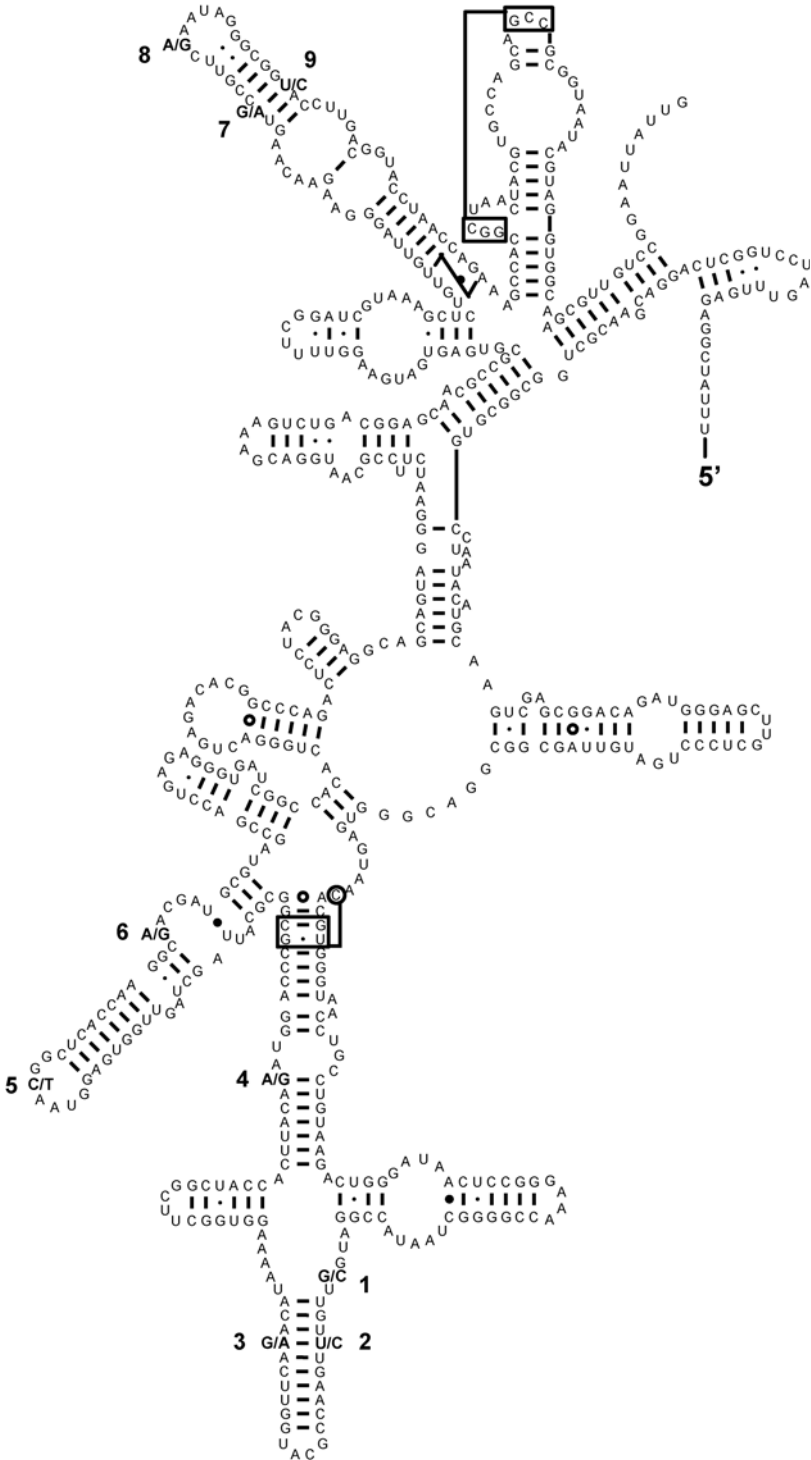


Рис. 2. Структура варибельного фрагмента 16S рРНК 5'-[1-575]-3' с указанием девяти нуклеотидных пар, которые являются полиморфными для бактерий, родственных виду *B. subtilis*

Профили полиморфных нуклеотидов в ДНК генов 16S рРНК у микроорганизмов группы *B. subtilis*.

Штаммы	Полиморфные нуклеотиды								
	1 180 н*	2 185 н	3 202 н	4 234 н	5 271 н	6 285 н	7 465 н	8 472 н	9 483 н
П1. <i>B. amyloliquefaciens</i> B-5017, B-5033, B-5036, B-5044, B-5113, At1, At4, DSM7_rrnA, DSM7_rrnB, FZB_A, FZB_B, FZB_G, FZB_J	G	C	G	G	C	G	G	A	C
П2. <i>B. amyloliquefaciens</i> DSM7 rrnC,D,E,F,H,I,J	C	T	A	G	C	G	G	A	C
П3. Аллели штамма <i>B. amyloliquefaciens</i> FZB42: FZB_rrnC, FZB_D, FZB_rrnE, FZB_rrnH, FZB_rrnI, <i>B. velezensis</i> C6-1, 1-3, <i>Bacillus</i> sp. 51, <i>Bacillus</i> sp. 39	G	T	G	G	C	A	G	A	C
П4. <i>B. atrophaeus</i> DSM 7264 [†] , <i>B. vallismortis</i> BCRC 17183	C	T	A	G	C	A	G	A	C
П5. <i>B. atrophaeus</i> ATCC51189, GBSC56, LSSC22; <i>B. vallismortis</i> DSM 11031 [†]	C	T	A	G	T	A	G	A	C
П6. <i>B. axarquiensis</i> LMG 22476, LNXM37; <i>B. malacitensis</i> LMG 22477; <i>B. mojavensis</i> eela 2293, 3EC4B2; <i>B. subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> DSM 347 [†] ; ATCC 6633 rrnAB	C	T	A	G	T	A	A	G	T
П7. <i>B. mojavensis</i> DSM 9205 [†] , B-5051, At3	C	T	A	G	C	A	A	G	T
П8. <i>B. velezensis</i> CR-502 [†]	G	T	G	A	C	A	G	A	C
П9. <i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> DSM 10 [†] , B-5184, At2, At5, rrnB, D, G, H, W	G	T	A	G	C	A	A	G	T
П10. <i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> B-5049, B-5137, rrnE, rrnI	G	T	A	G	T	A	A	G	T
Аллели штамма <i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> 168:									
П11. rrnA	G	T	A	G	C	G	A	G	T
П12. rrnC	G	T	A	G	C	G	G	G	T
П13. rrnJ	G	T	A	G	T	A	G	G	T
П14. <i>B. subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> B-5008, 5075	C	T	A	A	C	A	A	G	T
П15. <i>B. subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> B-5014	C	T	A	A	T	A	A	G	T

Примечание. * Полиморфные нуклеотиды пронумерованы последовательно как на рис. 1. Под номерами нуклеотидов показаны их координаты от 5'-конца гена 16S рРНК

Для выяснения филогенетических отношений между этими штаммами по профилям варьируемых нуклеотидов использовалась базовая программа построения парсимониальных филогенетических деревьев *pars.exe* пакета Phylip. Этот алгоритм, предназначенный для анализа комбинаций текстовых символов, наиболее подходит в данном случае, поскольку специализированные программы для сравнения фрагментов ДНК требуют более длинных последовательностей нуклеотидов. Результат группирования штаммов показан на рис. 3.

Филогенетический анализ позволил сделать ряд интересных наблюдений. Рассмотренные штаммы формируют две четко различимые группы, соответствующие двум видам *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens*. Подвиды этих видов и недавно описанные виды *B. atrophaeus*, *B. vallismortis*, *B. velezensis* (близкие к *B. amyloliquefaciens*) и *B. axarquiensis*, *B. malacitensis*, и *B. mojavensis* (близкие к *B. subtilis*) невозможно надежно отличить по последовательностям генов 16S рРНК, так как разные аллели одного и того же микроорганизма отличаются сильнее друг от друга, чем гены, выделенные от разных микроорганизмов. Штаммы 39 и 51 наиболее

близки к *B. amyloliquefaciens*, поэтому определение их по фенотипу как *B. subtilis* было ошибочным. Полученные сиквенсы совпадают с известной последовательностью гена 16S рРНК у штамма *B. velezensis* С6-1, но также совпадают с последовательностями аллелей этого гена у *B. amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* FZB42.

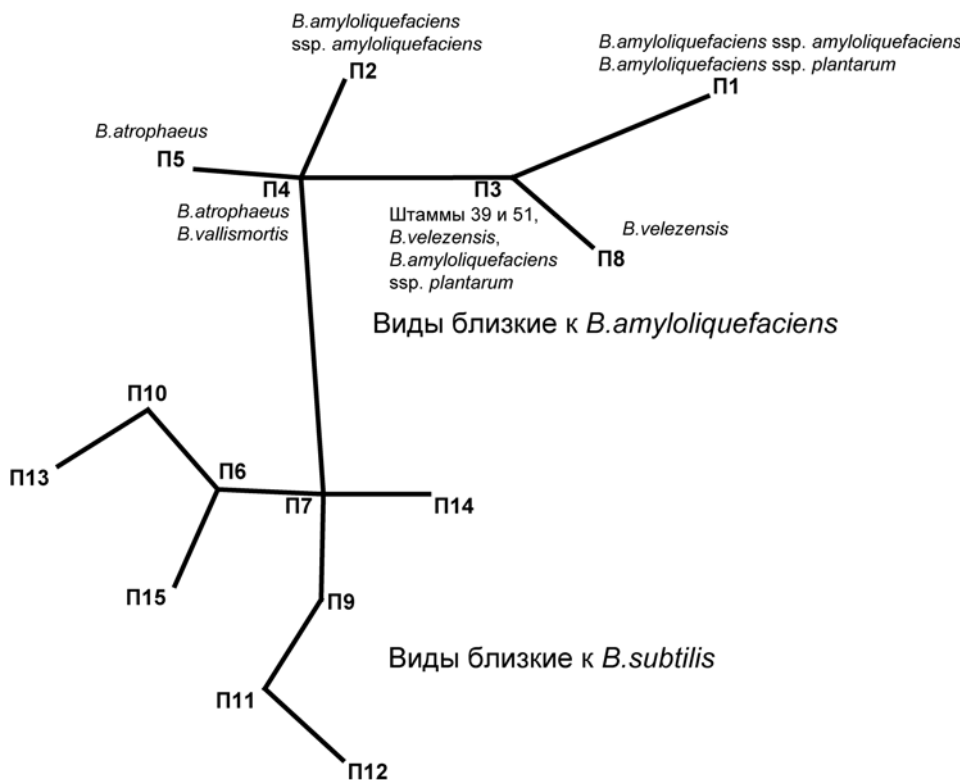


Рис. 3. Дендрограмма отношений подобия между профилями переменных нуклеотидов в гене 16S рРНК и микроорганизмов группы *B. subtilis*.

Для уточнения таксономического положения штаммов 39 и 51 был установлен жирнокислотный состав клеточной стенки этих культур. Содержание жирных кислот в клеточной стенке бактерий – важный таксономический признак, который часто используется для их классификации и идентификации [1]. Преобладание разветвленных жирных кислот в жирнокислотном профиле является характерным признаком бактерий рода *Bacillus*. По данным Kaneda содержание разветвленных жирных кислот у бацилл составляет от 54 до 85 % общего жирнокислотного пула клетки, включая как насыщенные, так и ненасыщенные кислоты с преобладанием изо-C15:0 и антиизо-C15:0. Также для них характерно высокое содержание антиизо-C17:0 и изо-C17:0 жирных кислот [1,15]. Содержание жирных кислот в исследуемых штаммах приведено в табл. 4. Исследуемые штаммы характеризовались большим содержанием разветвленных жирных кислот (изо- и антиизо- C15:0 и C17:0), которые составляли около 75–85 % от общего жирнокислотного пула. По жирнокислотному профилю оба штамма были схожими между собой, но отличались как от *B. subtilis*, так и от повидов *B. amyloliquefaciens*. По данным Borgiss et al. (2011) характерными особенностями штаммов *B. amyloliquefaciens* являются высокое содержание в клеточной стенке i-C15:0 в пределах 26–40 % и относительно высокое содержание C17:0 в пределах 3–11 % [9]. У штаммов 39 и 51 данные жирные кислоты составляют 0,24 и менее 1 % соответственно, тогда как содержание ai-C15:0 такое же, как у *B. amyloliquefaciens* и существенно меньше, чем у *B. subtilis*. Отличительной особенностью штаммов 39 и 51 является высокое содержание C16:0 в пределах 7–10%, что является также характерно для *B. velezensis* [10]. Содержание i-C15:0 у *B. velezensis* также близко к данным, полученным для штаммов 39 и 51. Таким образом, несмотря на совпадение после-

довательности 16S рРНК штаммов 39 и 51 с некоторыми аллелями *B. amyloliquefaciens* ssp. *plantarum*, данные штаммы не относятся к этому подвиду. В то же время с высокой долей вероятности можно утверждать, что штаммы 39 и 51 принадлежат виду *B. velezensis*. Важным открытием было то, что данные две культуры, безусловно, относящиеся к одному виду и подвиду, существенно отличаются по проявляемой биологической активности, о чем говорилось выше. Действительно, сравнительный анализ полных геномов штаммов подвидов *B. amyloliquefaciens* ssp. *amyloliquefaciens* DSM 7[†] и *B. amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* FZB42 показал неожиданно большие отличия между этими штаммами по числу генов, кодирующих синтез полипептидных антибиотиков, что определяет их биологическую активность [20]. Таким образом, перспективность использования культур в составе пробиотиков во многом обусловлено уникальной комбинацией штаммовых свойств, а не видовых и подвидовых признаков.

Таблица 4

Жиринокислотный состав штаммов рода *Bacillus*

	Содержание жирных кислот, %					
	39	51	CCUG	DSM7	FZB42	CR502
i-C14:0	1,00	1,53	1,6	0,99	0,43	1,08
C14:0	0,99	0,83	–	0,36	1,21	2,96
i-C15:0	24,75	24,35	20,6	40,29	31,0	29,86
ai-C15:0	29,38	31,96	44,1	28,32	31,73	32,7
C15:0	2,24	2,36	–	–	–	–
i-C16:0	2,54	4,44	2,4	2,13	1,01	1,31
7-C16:1	0,37	0,45	–	0,42	0,19	–
C16:0	10,15	7,40	5,7	–	–	13,41
i-C17:0	15,23	13,63	10,9	13,14	12,11	7,67
ai-C17:0	11,15	11,95	15,8	–	–	4,27
C17:0	0,62	0,56	–	6,46	7,70	–
C18:2	0,24	0,00	–	–	–	–
cis-C18:1	0,44	0,00	–	–	–	–
C18:0	0,91	0,56	–	–	–	–

Примечание. 39 – *Bacillus* sp. 39; 51 – *Bacillus* sp., 51; CCUG – *B. subtilis* CCUG 10779 (данные получены с web-ресурса www.ccug.se); DSM7 – *B. amyloliquefaciens* ssp. *amyloliquefaciens* DSM 7[†] (Borriss et al., 2011); FZB42 – *B. amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* FZB 42[†] (Borriss et al., 2011); CR502 – *B. velezensis* CR 502[†] (Ruiz-García et al, 2005); «–» – данные отсутствуют.

**Л.А. Сафронова¹, Л.Б. Зелена¹, В.В. Клочко¹, Л.В. Авдеева¹, О.М. Рева²
В.С. Підгорський¹**

¹ Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України, Київ

² University of Pretoria, Department of Biochemistry, Bioinformatics and Computational Biology Unit, Pretoria, South Africa

ГЕНО- ТА ФЕНОТИПОВА ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАМІВ БАЦИЛ – КОМПОНЕНТІВ ЕНДОСПОРИНУ

Резюме

Пробіотик ендоспорин використовується у ветеринарії для профілактики та лікування дисбактеріозів, кишкових інфекцій, гнійних ран і післяпологових ендометритів у сільськогосподарських тварин. До складу пробіотика входять два штами бактерій роду *Bacillus*, які проявляють помітний антагонізм відносно широкого спектра патогенних мікроорганізмів, характеризуються протеазною активністю, а також виділяють у живильне середовище комплекс бактеріо- і дріжджолітичних ферментів і поліса-

харидів. За спектром біологічної активності культури доповнювали одна одну. Для визначення видової приналежності цих штамів були встановлені послідовності гена 16S рРНК і вивчений жирнокислотний склад клітинної стінки. Встановлено, що штами належать до виду *B. velezensis*. У статті дискутуються недоліки ідентифікації родинних видів за геном 16S рРНК і запропонований метод складання профілів поліморфних нуклеотидів. Показано, що перспективність використання культур у пробіотиках визначається не видовими, а унікальними штамовими характеристиками культур.

Ключові слова: *Bacillus*, 16S рРНК, пробіотик, Ендоспорин, антагоністична активність, біологічно активні речовини.

L.A. Safronova¹, L.B. Zelena¹, V.V. Klochko¹, L.V. Avdeeva¹, O.N. Reva², V.S. Pidgorskyi¹

¹ Zabolotnyi Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

² University of Pretoria, Department of Biochemistry, Bioinformatics and Computational Biology Unit, Pretoria, South Africa

GENO- AND PHENOTYPIC CHARACTERISTIC OF BACILLUS STRAINS – COMPONENTS OF ENDOSPORIN

S u m m a r y

Endosporin is used in veterinary for the prophylaxis and treatment of disbacteriosis, intestinal infections, festering wounds and postpartum pyoinflammatory complications in agricultural animals. The probiotic is based on two *Bacillus* strains which inhibit growth of a broad spectrum of pathogenic microorganisms and synthesise proteolytic enzymes and other biologically active secondary metabolites, particularly – polysaccharides. The activity of these two strains was supplementary. For the species identification of these strains, sequences of 16S rRNA genes and fatty acid content of cell walls were analysed. It was found that the both strains belong to *B. velezensis*. Limitations of application of 16S rRNA sequences for identification of closely related species are discussed in the paper. A method of 16S rRNA sequence profiling by polymorphic nucleotides was proposed. It was also shown that usefulness of *Bacillus* strains in probiotics is mostly based on their unique strain specific properties rather than on general species characteristics.

The paper is presented in Russian.

Key words: *Bacillus*, 16S rRNA, probiotic, Endosporin, antagonistic activity, biologically active compounds.

The authors address: Safronova L.A., Zabolotnyi Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D 03680, Ukraine.

1. Васюренко З.П., Фролов А.Ф. Жирнокислотный состав бактерий как хемотаксономический критерий // Журн. гигиены, эпидемиологии, микробиологии и иммунологии (Прага). – 1986. – 30, №3. – С.293–300.
2. Захарова И. Я., Косенко Л. В. Методы изучения микробных полисахаридов. — Киев: Наук. думка, 1982. – 192 с.
3. Клочко В.В., Остапчук А.Н., Буценко Л.Н., Онищенко О.М., Киприанова Е.А. Жирнокислотный состав бактерий рода *Psychrobacter*, выделенных из воды Черного моря // Микробиологія і біотехнологія. – 2008. – № 1. – С. 44 – 49.
4. Лазарева Д.Н., Алехин Е.К. Стимуляторы иммунитета. – М.: Медицина, 1985. – 255 с.
5. Осадчая А.И., Кудрявцев В.А., Сафронова В.А. Аэробы рода *Bacillus* как источник продуцентов литических ферментов // Биотехнология. – 2004. – №4. – С.24 – 33.
6. Пат.14569 Украина, А61К35/74,С12 N1/20. Биопрепарат эндоспорин для лечения и профилактики эндометритов животных / В.В.Смирнов, В.А.Кудрявцев, А.И.Осадчая, Г.Н.Калиновский, Л.А.Сафронова. – Оpubл. 11.10.99, Бюл. №6.
7. Пат.76669 Украина, А61К35/74, А61Р 31/00. Биопрепарат для лікування та профілактики кишкових та гнійних інфекцій у тварин / Л.А.Сафронова, А.І.Осадча, В.О.Кудрявцев. – Оpubл.01.08.2006, Бюл. №8.

8. Смирнов В.В., Резник С. П., Сорокулова И. Б. Методические рекомендации по выделению и идентификации бактерий рода *Bacillus* из организма человека и животных. — Киев, 1983. — 50 с.
9. Borriss R., Chen X.-H., Rueckert C., Blom J., Becker A., Baumgarth B., Fan B., Pukall R., Schumann P., Spröer C., Junge H., Vater J., Pühler A., Klenk H.-P. Relationship of *Bacillus amiloliquefaciens* clades associated with strains DSM7^T and FZB42: a proposal for *Bacillus amiloliquefaciens* subsp. *amiloliquefaciens* subsp. nov. and *Bacillus amiloliquefaciens* subsp. *plantarum* subsp. nov. based on their discriminating complete genome sequences // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. — 2011. — (published online ahead of print on 3 September 2010 as doi:10.1093/ijs.0.023267-0).
10. Connor N., Sikorski J., Rooney P., Kopac S., Koeppl A.F., Burger A., Cole S.G., Perry E.B., Krizanc D., Field N.C., Slaton M., Cohan F.M. Ecology of speciation of the genus *Bacillus* // Appl. Environ. Microbiol. — 2010. — **76**. — P. 1349–1358
11. Czerucka D, Rampal P. Experimental effects of *Saccharomyces boulardii* on diarrheal pathogens // Microbes Infect. — 2002. — **4**. — P. 733–739.
12. Duc L. H., Hong H. A., Barbosa T. M., Hendriques A. O., Cutting S. M. Characterization of *Bacillus* probiotics available for human use // Appl. Environ. Microbiol. — 2004. — **70**, N4. — P. 2161–2171.
13. Goto K., Omura T., Hara Y., Sadaie Y. Application of the partial 16S rDNA sequence as an index for rapid identification of species in the genus *Bacillus* // J. Gen. Appl. Microbiol. — 2000. — **46**. — P. 1–8.
14. Guidelines for the Evolution of Probiotics in Food. Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evolution of Probiotics in Food. — London, Ontario, Canada. — 2002. — April 30 and May 1.
15. Kaneda T. Fatty acids of the genus *Bacillus*; an example of branched-chain preferences // Bacteriol. Rev. — 1977. — **41**, N2. — P.391–418.
16. Kitazawa H., Ishii Y., Uemura J., Kawai Y., Saito T., Kaneko T., Noda K., Itoh T. Augmentation of macrophage functions by an extracellular phosphopolysaccharide from *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* // Food Microbiology. — 2000. — **17**. — P. 109–118.
17. Lane D.G. Nucleic acids techniques in bacterial systematic // Ed. by E. Stackebrandt and M. Goodfellow. — Chichester, United Kingdom: John Wiley, 1991. — P.115–175.
18. Reva O.N., Sorokulova I.B., Smirnov V.V. Simplified technique for identification of the aerobic spore-forming bacteria by phenotype// Int. J. Syst. Evol. Microbiol. — 2001. — P. 1361–1371.
19. Reva O. N., Dixelius C., Meijer J., Priest F. Taxonomic characterization and plant colonizing ability of some bacteria related to *Bacillus amiloliquefaciens* and *Bacillus subtilis* // FEMS Microbiol. Ecol. — 2004. — **48** — P. 249–259.
20. Rückert C, Blom J, Chen X, Reva O, Borriss R. Genome sequence of *B. amiloliquefaciens* type strain DSM7^T reveals differences to plant-associated *B. amiloliquefaciens* FZB42// J. Biotechnol. — 2011. — Jan 22. — [Publ. ahead of print]
21. Staden R., Beal K.F., Bonfield J.K. The Staden package 1998 // Methods Mol. Biol. — 2000. — **132**. — P. 115–130.
22. Sorokulova I. Preclinical testing in the development of Probiotics: Regulatory perspective with *Bacillus* strains as an example // Clinical Infectious Diseases. — 2008. — **46** (Suppl 2)
23. Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 // Molecular Biology and Evolution. — 2007. — **24**. — P. 1596–1599.

Отримано 16.05.2011