

Д.А. Жукова<sup>1</sup>, В.В. Клочко<sup>1</sup>, Л.Б. Зелена<sup>1</sup>, О.М. Рева<sup>2</sup>, І.В. Драговоз<sup>1</sup>,  
Л.В. Авдєєва<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України  
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, МСП 03680, Україна

<sup>2</sup>University of Pretoria, Dep. Biochemistry, Lynnwood Rd., Hillcrest, Pretoria, South Africa

## ТАКСОНОМІЧНИЙ АНАЛІЗ ШТАМУ *BACILLUS* SP. УКМ В-7404 – АНТАГОНІСТА ФІТОПАТОГЕННИХ МІКРОМІЦЕТІВ

Проведено поліфазний таксономічний аналіз штаму *Bacillus* sp. УКМ В-7404, активного щодо фітопатогенних грибів і здатного до синтезу позаклітинних фітогормонів, літичних ферментів та антифунгальних сполук ліпопептидної природи. Основні жирні кислоти клітинних стінок штаму *Bacillus* sp. УКМ В-7404 були представлені розгалуженими похідними ізо- та антеізо- С15:0 та С17:0 кислот, що складала біля 65-77 % від загального пулу.

Філогенетичний аналіз нуклеотидної послідовності гену 16S рРНК штаму *Bacillus* sp. УКМ В-7404, а також фенотипові і хемотаксономічні ознаки свідчили про приналежність *Bacillus* sp. УКМ В-7404 до підвиду *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*.

Ключові слова: бактерії роду *Bacillus*, поліфазний таксономічний аналіз, вид *Bacillus amyloliquefaciens*.

Бактерії роду *Bacillus* – одна з найбільш розповсюджених груп мікроорганізмів у природі. Широка мінливість цих бактерій і різноманітна біологічна активність обумовлюють високу внутрішньовидову гетерогенність деяких видів бацил. Незважаючи на те, що бацили описані вже більш як 100 років тому, систематика роду до цього часу розвивається і вдосконалюється. Так, з використанням генетичних методів досліджень було встановлено, що вид *Bacillus subtilis* складається з групи споріднених видів і підвидів, які можна відокремити один від одного шляхом генетичного типування методом RAPD-аналізу та за сиквенсом гену 16S рРНК [12]. В складі виду *B. subtilis* виявлено сукупність споріднених видів і підвидів, до яких відносять *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus mojavenis*, *Bacillus vallismortis*, *Bacillus velezensis* [9].

Здатність бактерій роду *Bacillus* синтезувати широкий спектр вторинних метаболітів з високою біологічною активністю робить доцільним їх використання при створенні біопрепаратів для рослинництва [13]. За результатами скринінгу, проведеного серед бактерій роду *Bacillus* з колекції відділу антибіотиків Інституту мікробіології і вірусології, було відібрано штами, високо активні щодо фітопатогенів зернових культур [4]. Найбільш активним виявився штаму *Bacillus* sp. УКМ В-7404, активний щодо фітопатогенних грибів: *Fusarium graminearum*, *Rhizium sylvaticum*, *Gaeumannomyces graminis*, *Rhizoctonia solani*. В попередніх дослідженнях за рядом фенотипових ознак даний штаму було віднесено до виду *B. subtilis*. На сьогодні відомо, що група *B. subtilis* поряд із кількома названими вище спорідненими видами включає підвиди *B. subtilis* subsp. *subtilis*, *B. subtilis* subsp. *spizizenii* та *Bacillus sonorensis* [6].

Метою роботи було встановлення видової приналежності штаму *Bacillus* sp. 7404 з застосуванням методів поліфазного таксономічного аналізу.

**Матеріали та методи.** Об'єктом досліджень був антагоністично-активний штаму *Bacillus* sp. УКМ В-7404, відібраний з колекції відділу антибіотиків Інституту мікробіології і вірусології.

**Фізіолого-біохімічні дослідження.** Культуральні та морфологічні властивості вивчали при вирощуванні штаму на сусло-агарі та на середовищі 15 наступного складу (г/л): глюкоза – 15, цитрат натрію – 1,29, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 4,75, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 9,63, MgSO<sub>4</sub> – 0,18.

Окислення глюкози і маніта на середовищі Хью-Лівсона, наявність аргініндигідролази, лізин- та орнітиндекарбоксилази, здатність до утворення гідролітичних ферментів, асиміляцію органічних джерел вуглецю проводили згідно з методичними рекомендаціями [10].

**Електронно-мікроскопічні дослідження.** Морфологію клітин вивчали методом трансмісійної електронної мікроскопії з використанням мікроскопа JEM-1400 («Jeol», Японія) при прискорюючій напрузі 80 кВ. Контрастування проводили розчином 2% ураніацетату в етиловому спирті.

**Жирнокислотний склад** клітинних ліпідів (метилових ефірів жирних кислот) вивча-

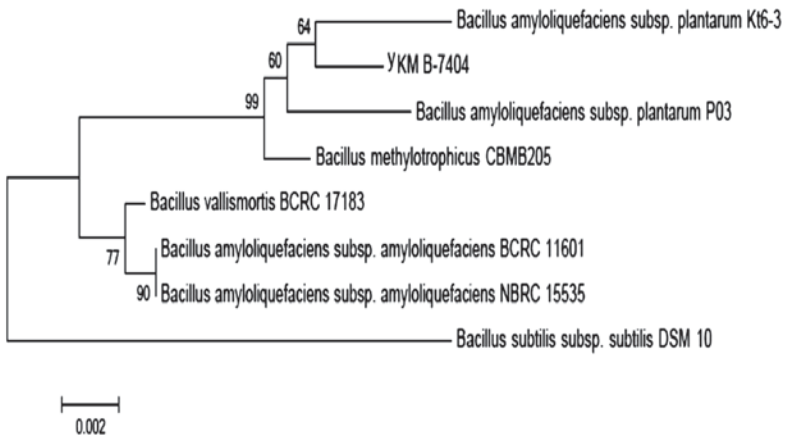
ли методом хромато-мас-спектрометрії. Дослідження проводили на хроматографі Agilent 6890N з мас-спектрометричним детектором Agilent 5973 inert (капілярна колонка HP-5MS (J&W Scientific, USA)). Використовували стандарт метилових ефірів жирних кислот бактерій (Supelco, № 4708-U, USA). Для обробки даних використовували пакет комп'ютерних програм «ChemStation».

**Визначення і аналіз нуклеотидної послідовності гена 16S рPHK.** Ампліфікацію гена 16S рPHK проводили з праймерами 27f і 1492r, згідно з стандартним протоколом [5]. Очищений ПЛР-продукт секвенували в двох напрямках на приладі "Genetic Analyzer 3130" з набором реактивів "BigDye Terminatorv3.1 Cycle Sequencing Kit". Первинний порівняльний аналіз секвенованої послідовності проводили за допомогою програми NCBI Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Філогенетичний аналіз і порівняння нуклеотидних послідовностей гена 16S рPHK представників різних видів роду *Bacillus* здійснювали як описано у роботі [12]. Дендрограму філогенетичних відносин отримали методом найближчого зв'язування (Neighbor Joining) з використанням двохпараметричної моделі Кімури за 100 репліками бутстреп-аналізу з використанням програми MEGA 5 [14]. Послідовності гена 16S рPHK типових культур бактерій роду *Bacillus* були отримані з баз даних GenBank і web-ресурсу [www.straininfo.net](http://www.straininfo.net).

**Результати та їх обговорення.** Штам *Bacillus* sp. УКМ В-7404 був представлений грам-позитивними, рухливими паличками довжиною 1,5-1,7 мкм і діаметром 0,4-0,5 мкм, з полярними джгутиками. Штам утворював спори, які займали центральне положення в клітині за бацилярним типом розміщення. На картопляному агарі та сусло-агарі утворював колонії світло-бежевого кольору, матові, шершаві, що вросли в агар, не утворюючи слизу та не синтезуючи пігменту.

У результаті аналізу фрагмента гена 16S рPHK штаму УКМ В-7404 довжиною 1126 п.н. було виявлено 99 % ідентичності з представниками декількох видів роду *Bacillus*, зокрема з *B. methylotrophicus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. valismortis* та *B. subtilis*. З метою зв'язування систематичного положення досліджуваного штаму серед типових штамів інших видів роду *Bacillus* на основі нуклеотидних послідовностей гена 16S рPHK була побудована дендрограма, представлена на рис. 1, з аналізу якої випливає, що штам УКМ В-7404 найбільш вірогідно належить до виду *B. amyloliquefaciens* підвиду *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*. Нуклеотидна послідовність штаму була депонована в базі даних GenBank за номером KC 693647.

*B. amyloliquefaciens* є видом, що належить до групи *B. subtilis*, яка містить у своєму складі фенотипово, біохімічно та екологічно подібні види. Деякі відмінності полягають у нуклеотидному складі бактеріального геному, співвідношенні типів жирних кислот, що входять до клітинної стінки, синтезі деяких вторинних метаболітів тощо [6, 9]. Вперше вид *B. amyloliquefaciens* був відокремлений з групи *B. subtilis* у 1987 році [8] за допомогою порівняння нуклеотидної послідовності гену 16S рPHK досліджуваного штаму з послідовностями того самого гену типових штамів *B. subtilis*.



**Рис.1.** Дендрограма філогенетичних взаємовідносин між штамом *Bacillus* sp. УКМ В-7404 та типовими штамми роду *Bacillus*

У нашій попередній роботі [12] було запропоновано проводити точну ідентифікацію підвидів бактерій групи *B. subtilis* за найбільш інформативними поліморфними нуклеотидами у сиквенсі гену 16S рРНК. Порівняння профілів поліморфних нуклеотидів (табл. 1) підтвердило приналежність штаму УКМ В-7404 до підвиду *B. amyloliquefaciens* ssp. *plantarum*.

Таблиця 1

**Профілі поліморфних нуклеотидів сиквенсів гену 16S рРНК у бактерій групи *B. subtilis***

Види та штами	Місія локалізації поліморфних нуклеотидів з 5' кінця сиквенса гену 16S рРНК								
	180	185	202	234	271	285	465	472	483
Штам УКМ В-7404	G	C	G	G	C	G	G	A	C
<i>B. amyloliquefaciens</i> ssp. <i>plantarum</i>	G	C	G	G	C	G	G	A	C
	G	T	G	G	C	A	G	A	C
<i>B. amyloliquefaciens</i> ssp. <i>amyloliquefaciens</i> ;	C	T	A	G	C	G	G	A	C
<i>B. atrophaeus</i> та <i>B. vallismortis</i>	C	T	A	G	C	A	G	A	C
	C	T	A	G	T	A	G	A	C
<i>B. axarquiensis</i> , <i>B. malacitensis</i> , <i>B. mojavensis</i> та <i>B. subtilis</i> ssp. <i>spizizenii</i>	C	T	A	G	T	A	A	G	T
<i>B. subtilis</i> ssp. <i>subtilis</i>	G	T	A	G	C	A	A	G	T
	G	T	A	G	T	A	A	G	T
	G	T	A	G	C	G	A	G	T
	G	T	A	G	C	G	G	G	T
	G	T	A	G	T	A	G	G	T
<i>B. sonorensis</i>	C	T	A	G	G	G	A	G	A

Спектри вуглецевого живлення та ферментативна активність *Bacillus* sp. УКМ В-7404 виявилися ідентичними типовому штаму *B. amyloliquefaciens* DSM 7 (табл. 2).

Таблиця 2

**Фізіолого-біохімічна характеристика штаму *Bacillus* sp. УКМ В-7404**

Характеристика	<i>Bacillus</i> sp. УКМ В-7404	<i>B. amyloliquefaciens</i> DSM 7 [12]
Забарвлення по Граму	+	+
Гідроліз крохмалю	+	+
Оксидазна активність	+	+
Каталазна активність	+	н
Уреазна активність	-	н
Активність β-галактозидази	+	+
Утилізація цитрату	+	+
Лізіндекарбоксилаза	-	-
Орнітіндекарбоксилаза	-	-
Асиміляція глюкози	+	+
Асиміляція сорбіту	+	+
Асиміляція рамнози	+	+
Асиміляція сахарози	+	+
Асиміляція мелібіози	+	+
Асиміляція амігдаліну	+	+
Асиміляція арабінози	+	+

**Примітка:** “+” – наявність ознаки, “-” – відсутність ознаки, “н” – дані не наведено.

Склад жирних кислот у клітинних стінках мікроорганізмів є важливою таксономічною ознакою, що часто використовують для їх класифікації та ідентифікації. Домінування розгалужених жирних кислот у клітинних стінках є характерною ознакою бактерій роду *Bacillus*. Сумарний вміст розгалужених жирних кислот у клітинних стінках бацил складає 54-85 % загального жирнокислотного пулу клітини, включаючи як насичені, так і ненасичені кислоти, серед яких переважають ізо-C15:0 та антеізо-C15:0. Також характерний високий вміст ізо-C17:0 та антеізо-C17:0 кислот [1].

Таблиця 3

**Жирнокислотний склад штаму *Bacillus* sp УКМ В-7404**

	Вміст жирних кислот,%	
	<i>Bacillus</i> sp. УКМ В-7404	<i>B. amyloliquefaciens</i> DSM 7
C12:0	0,42	н
C14:0	0,36	1,7
i-C15:0	21,77	21,3
ai-C15:0	30,85	38,3
C15:0	0,83	н
i-C16:0	0,45	5,1
7-C16:1	0,63	н
C16:0	11,82	6,0
i-C17:0	7,12	10,4
ai-C17:0	5,34	11,1
C18:0	19,08	1,6

**П р и м і т к а:** Дані жирнокислотного складу типового штаму *B. amyloliquefaciens* УКМ DSM 7 (CCUG 10779) отримано з web-ресурсу Колекції культур університету Гетеборга, Швеція ([www.ccug.se](http://www.ccug.se)); «н» – дані не наведено.

Штам *Bacillus* sp. УКМ В-7404 характеризувався високим вмістом розгалужених жирних кислот (ізо- та антеізо- C15:0 та C17:0), що складали біля 65-77 % від загального жирнокислотного пулу (табл. 3). Для порівняння – у представників виду *B. amyloliquefaciens* вміст жирної кислоти i-C15:0 складає 26-40 %, а C17:0 знаходиться в межах 3 – 11 % [2]. У штаму УКМ В-7404 вміст i-C15:0 знаходився в межах 21-24 %, а загальний вміст C17:0 становив 10-12 %. Зазначимо, що вміст таких жирних кислот як C14:0, C15:0, i-C16:0, 7-C16:1 не перевищував 1 %. Таким чином, згідно з аналізом жирнокислотних профілів досліджуваних штамів їх можна віднести до представників виду *B. amyloliquefaciens*.

Бактерії, що належать до виду *B. amyloliquefaciens*, виділяють переважно з ризосфери або з самих рослин, зокрема, з сої, ріпаку, арабідопсису тощо. Відповідно, більшість штамів цього виду є ендоефітними, і їх присутність в організмі рослин зумовлює стійкість останніх до фітопатогенів [2]. Спектр антибіотиків, до синтезу яких здатний вид *B. amyloliquefaciens*, представлений ліпопептидами (це характерно для більшості представників бактерій роду *Bacillus*), тоді як синтез ітуруни, фенгіцину та бациломіцину є характерним для більшості штамів *B. amyloliquefaciens* та деяких штамів *B. subtilis*.

Штам *Bacillus* sp. УКМ В-7404 відзначався високою антифунгальною активністю щодо фітопатогенних мікроміцетів *F. graminearum* та *Bipolaris sorokiniana*, обумовленою здатністю до синтезу антибіотичних сполук ліпопептидної природи, ймовірно, з родини фенгіцинів.

Показано, що деяким штамам *B. amyloliquefaciens* властива здатність до синтезу таких літичних екзоферментів, як целюлази, ксиланази та хітинази [2, 3]. Досліджуваний штам бацил в якісних реакціях на позаклітинну ферментативну активність проявляв протеолітичну, амілолітичну, целюлозну, ксиланазну та хітиназну активності. Не було виявлено екзогенної ліполітичної та пектиназної активностей. За умови, що синтез екзоферментів носить індукційний характер, слід відзначити, що штаму притаманний досить широкий спектр літичної активності.

Також відомо, що штами виду *B. amyloliquefaciens*, асоційовані з рослинами, синтезують фітогормони ауксини (переважно індоліл-3-оцтову кислоту, ІОК), фізіологічно активні форми цитокінінів (зеатини, зеатин-рибозид), гібереліни [3]. Деяким штамам властива також здатність до синтезу етилену, що виконує роль сигнальних молекул при взаємодії мікроорганізмів з рослиною. Встановлено, що кількісний і якісний склад екзометаболітів фітостимулюючої дії залежить від штаму та умов його культивування [7]. Штаму *Bacillus* sp. УКМ В-7404 також притаманна гормонсинтезувальна здатність, що досліджувалася в умовах *in vitro*. Так, серед позаклітинних фітогормонів-стимуляторів було відзначено високий рівень синтезу ауксинів, зокрема ІОК, та порівняно низький синтез цитокінінів. Серед гормонів інгібуючої дії штаму був здатний до синтезу як абсцизової кислоти, так і етилену.

Отже, за своїми морфологічними, біохімічними, хемотаксономічними ознаками, а також за даними сиквенсу гена 16S рРНК, штаму *Bacillus* sp. УКМ В-7404 було віднесено до підвиду *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*.

**Д.А. Жукова<sup>1</sup>, В.В. Клочко<sup>1</sup>, Л.Б. Зелена<sup>1</sup>, О.Н. Рева<sup>2</sup>,  
И.В. Драговоз<sup>1</sup>, Л.В. Авдеева<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Інститут мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Київ

<sup>2</sup>University of Pretoria, Dep. Biochemistry, South Africa

## **ТАКСОНОМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ШТАММА BACILLUS SP. УКМ В-7404 – АНТАГОНИСТА ФИТОПАТОГЕННЫХ МИКРОМИЦЕТОВ**

### **Резюме**

Проведен полифазный таксономический анализ штамма *Bacillus* sp. УКМ В-7404, активного по отношению к фитопатогенным грибам и способного к синтезу экзогенных фитогормонов, литических ферментов и антифунгальных соединений липопептидной природы. Основные жирные кислоты клеточных стенок штамма *Bacillus* sp. УКМ В-7404 представлены разветвленными производными изо- и антеизо С15:0 та С17:0 кислот, что составляло около 65-77 % их общего пула.

Филогенетический анализ нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК штамма *Bacillus* sp. УКМ В-7404, а также фенотипические и хемотаксономические признаки свидетельствовали о принадлежности штамма *Bacillus* sp. УКМ В-7404 к подвиду *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*.

**К л ю ч е в ы е с л о в а:** бактерии рода *Bacillus*, полифазный таксономический анализ, вид *B. amyloliquefaciens*.

**D.A. Zhukova<sup>1</sup>, V.V. Klochko<sup>1</sup>, L.B. Zelena<sup>1</sup>, O.M. Reva<sup>2</sup>,  
I.V. Dragovoz<sup>1</sup>, L.V. Avdeeva<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

<sup>2</sup>University of Pretoria, Dep. Biochemistry, South Africa

## **THE TAXONOMIC STUDY OF THE STRAIN BACILLUS SP. UCM B-7404 – PHYTOPATHOGENIC FUNGAE ANTAGONIST**

### **Summary**

The polyphas taxonomic analysis of strain *Bacillus* sp. UCM B-7404 active against phytopathogenic fungi and producing extracellular phytohormones, lytic enzymes and lipopeptide antifungal compounds has been carried out. The basic cell wall fatty acids presented by branched iso- and anteiso- C15:0 and C17:0 acids, contained 65-77 % of the average pool.

Phylogenetic assay of 16S rRNA gene nucleotide sequence, phenotypic and chemotaxonomic characteristics proved the attachment of strain *Bacillus* sp. UCM B-7404 to *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*.

The paper is presented in Ukrainian.

**К е у о р д с:** bacteria of *Bacillus* genus, polyphase taxonomic assay, *Bacillus amyloliquefaciens* species.

**Т h e a u t h o r ' s a d d r e s s:** Zhukova D.A., Zabolotny 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. Borriss R., XiaoHua Chen, Rueckert C., Blom J., Becker A., Baumgarth B., Fan B., Pukall R., Schumann P., Sproer C., Junge H., Vater J., Puhler A., Klenk H. Relationship of *Bacillus amyloliquefaciens* clades associated with strains DSM 7<sup>1</sup> and FZB 42: a proposal for *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* subsp. nov. and *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* subsp. nov. based on their discriminating complete genome sequences // IJSEM. – 2011. – **61**. – P. 1786–1801.
3. Buensanteai N., Yuen G.Y., Prathuangwong S. The biocontrol bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* KPS46 produces auxin, surfactin and extracellular proteins for enhanced growth of soybean plant // Thai J. Agricultural Science. – 2008. – **41**, N 3-4. – P. 101–116.
4. Kriuchkova L., Dragovoz I., Zhukova D., Lapa S., Avdeeva L. Suppression of wheat diseases by new *Bacillus* strain. // Защита растений – проблемы и перспективы: Материалы докладов международного симпозиума (30–31 октября 2012 г.) – Кишинев, Молдова, 2012. – С. 296–298.
5. 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
6. Li-Ting Wang, Fwu-Ling Lee, Chun-Ju Tai and Hiroaki Kasai. Comparison of *gyrB* gene sequences, 16S rRNA gene sequences and DNA–DNA hybridization in the *Bacillus subtilis* group // Int. J. Syst. Evol. Microbiology. – 2007. – **57**. – P. 1846–1850.
7. Loon van L.C. Plant response to plant growth-promoting rhizobacteria // Eur. J. Plant. Pathol. – 2007. – **119**. – P. 243–254.
8. Priest F. G., Goodfellow M., Shute L. A., Berkeley R. C. W. *Bacillus amyloliquefaciens* sp. nov. norn. Rev// Int. J. Syst. Bacteriology. – 1987. – P. 69–71.
9. Reva Oleg N., Dixelius Christina, Meijer Johan, Priest Fergus G. Taxonomic characterization and plant colonizing abilities of some bacteria related to *Bacillus amyloliquefaciens* // FEMS Microbiol. and Ecol. – **48**. – 2004. – P. 249–259.
10. 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. – **51**(Pt 4). – P. 1361–1371.
11. Ruiz-García Cristina, Be' jar Victoria, Martí'nez-Checa Fernando, Llamas and Inmaculada, Quesada Emilia. *Bacillus velezensis* sp. nov., a surfactant producing bacterium isolated from the river Ve' lez in Málaga, southern Spain// Int. J. Syst. and Evol. Microbiology . – 2005. – **55**. – P. 191–195.
12. Safronova L.A., Zelena L.B., Klochko V.V., Reva O.N. Does the applicability of *Bacillus* strains in probiotics rely upon their taxonomy // Can. J. Microbiol. – 2012 – **58**(2). – P. 212–219.
13. Sartori M., Nesci A., Etcheverry M. Production of *Fusarium verticillioides* biocontrol agents, *Bacillus amyloliquefaciens* and *Micobacterium oleovorans*, using different growth media: evaluation of biomass and viability after freeze-drying // Food Additives and Contaminants. – **29**, N 2. – 2012. – P. 287–292.
14. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods // Molecular Biology and Evolution. – 2011. – **28**. – P. 2731–2739.

Отримано 10.01.2014