

МОЛЕКУЛЯРНОЕ СЕРОТИПИРОВАНИЕ *Bacillus thuringiensis*

© 2023 г. Е. В. Патрушева¹ *, Л. Н. Борщевская¹, А. А. Каниковская¹, С. П. Синеокий¹

¹Национальный биоресурсный центр “Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов”,
Научно-исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, 123182 Россия

*e-mail: lpatrush@gmail.com

Поступила в редакцию 29.09.2023 г.

После доработки 16.10.2023 г.

Принята к публикации 03.11.2023 г.

Разработан метод молекулярного серотипирования штаммов *Bacillus thuringiensis*, основанный на сравнении нуклеотидных последовательностей консервативных участков гена *flaA* пяти сероваров этого вида *Bacillus*: *sotto*, *kurstaki*, *israilensis*, *berliner* и *morrisoni*. Для амплификации целевого фрагмента ДНК сконструирован набор праймеров, универсальных для всех исследованных сероваров *B. thuringiensis*. Разработан алгоритм отнесения штамма к тому или иному серовару по степени гомологии нуклеотидной последовательности консервативного участка гена *flaA*. Валидацию метода проводили на сероварах 11 штаммов *B. thuringiensis* из коллекции Национального биоресурсного центра “Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов” (БРЦ ВКПМ). Полученные результаты по молекулярному серотипированию полностью совпали с данными серологических методов.

Ключевые слова: *Bacillus thuringiensis*, серовар, таксономическая идентификация, праймеры, *flaA*, флагеллин

DOI: 10.56304/S0234275823050083

Bacillus thuringiensis – объект постоянного интереса микробиологов из-за высокоэффективных инсектицидных свойств этого вида бактерий [1, 2], благодаря чему его штаммы используются для получения биологических препаратов. Наиболее широко принятая система классификации штаммов *B. thuringiensis* основана на жгутиковых (Н) антигенах [3, 4]. Предполагают, что жгутики обеспечивают специфический контакт с определенными отрядами насекомых [5, 6]. Знание о принадлежности к определенному серовару позволит упростить работу по подбору штаммов *B. thuringiensis* для получения на их основе инсектицидных препаратов специфической направленности к отдельным отрядам насекомых.

Флагеллин – это белковая субъединица жгутика, обладающая специфичностью к Н-антигену. Это основная молекула, определяющая тот или иной серотип/серовар бактерий. Традиционно для серотипирования используют реакцию агглютинации с антителами, специфичными к Н-антигенам. Метод Н-серотипирования, используемый в настоящее время, представляет собой эффективный инструмент для классификации в том числе штаммов вида *B. thuringiensis*. Несмотря на простоту выполнения, этот подход имеет ряд ограничений в случае *B. thuringiensis*. Традиционное се-

ротипирование – дорогостоящее и трудоемкое занятие. Этот анализ, во-первых, не исключает перекрестной реактивности антисывороток с разными серогруппами; во-вторых, антисыворотки доступны только в специализированных лабораториях; в-третьих, состав антител в препаратах может варьировать от партии к партии [7]. Кроме того, есть и другие тонкости: штаммы, не имеющие параспорального включения, автоматически могут считаться видом *Bacillus cereus*; некоторые штаммы *B. thuringiensis* способны к спонтанной агглютинации (“аутоагглютинируемые штаммы”) [4]. Разработка простых молекулярных подходов позволит решать такие задачи.

Методы молекулярного серотипирования, как правило, основаны на генетических мишенях. Так, специфичность Н-антигенов *B. thuringiensis* может стать альтернативой традиционному серотипированию. Молекулярные методы разработаны для серотипирования *Escherichia coli*. Молекулярное Н-типирование основано на различиях в первичной структуре гена *fliC*, который кодирует белок флагеллин [8]. Известно, что N- и C-концы флагеллина *E. coli* очень консервативны, поэтому различия в Н-типах этой бактерии обусловлены различиями в центральной области аминокислотной последовательности антигена [9]. Аналогичным об-

разом структурирован ген флагеллина *B. thuringiensis* [10]. Для дифференциации Н-типов *E. coli* разработан метод ПЦР, нацеленный на варибельную область гена *fliC* [11].

В случае с *B. thuringiensis* также предпринимались попытки применения молекулярных подходов для внутривидовой идентификации. Так, альтернативой серотипированию может стать метод случайно амплифицированной полиморфной ДНК (random amplified polymorphic DNA, RAPD) [12]. Авторы пытались адаптировать метод для определения серотипов, но, по-видимому, он требует доработки, так как из 57 исследованных сероваров 31 содержал по крайней мере один штамм с близкородственным или идентичным паттерном RAPD из другого серовара.

Неоднозначные результаты получены при определении Н-серотипов *B. thuringiensis* по генам *fliC* и *hag* [13, 14]. Остается открытым вопрос идентификации истинного гена флагеллина, кодирующего серотипспецифический белок *B. thuringiensis*.

При применении другого подхода, основанного на анализе мультилокусного типирования последовательностей (multilocus sequence typing, MLST), установлено лишь частичное соответствие результатов MLST с использованием 7 генов домашнего хозяйства (*glpF*, *gmK*, *ilvD*, *pta*, *pur*, *pycA* и *tpi*) полученным традиционным серотипированием [15]. По-видимому, MLST не стоит рассматривать в качестве перспективного метода для определения серотипа бактериальных штаммов.

Таким образом, разработка простого и универсального метода для серотипирования штаммов *B. thuringiensis* остается актуальной задачей. Цель работы – разработка метода, основанного на молекулярно-генетическом анализе различий сероваров *B. thuringiensis*.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Реактивы

В работе использованы компоненты питательных сред: триптон, пептон, дрожжевой экстракт, глюкоза и агар – компании “Диа-М” (Россия); ферменты для молекулярных работ фирмы Thermo Fisher Scientific (США); все реактивы марки “х.ч.” или “ч.д. а.” фирмы “Химмед” (Россия).

Штаммы и условия культивирования

Из коллекции БРЦ ВКПМ НИЦ “Курчатовский институт” были получены следующие штаммы *B. thuringiensis*: В-3252, В-3269, В-3270, В-3360, В-3699, В-4642, В4853, В-4871, В-5689, В-6306, В-5246 (АТСС 35646) и типовой штамм *B. thuringiensis* ser. *berliner* В-9873 (DSM 2046). Все

штаммы выращивали при температуре 28–30°C в среде LB, г/л: триптон – 10; дрожжевой экстракт – 5; NaCl – 5.

Анализ нуклеотидной последовательности *flaA*

Известные нуклеотидные последовательности генов *flaA* различных сероваров *B. thuringiensis* были взяты из базы данных сервера BV-BRC (<https://www.bv-brc.org/>). Анализ нуклеотидных последовательностей проводили с использованием сервера BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), множественное выравнивание – с помощью программы ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalW>).

Генно-инженерные манипуляции

Хромосомную ДНК из клеток *B. thuringiensis* выделяли с использованием набора реagens ДНК-экспресс (“Синтол”, Россия). Выделение и очистку ПЦР-продуктов проводили с использованием набора GeneJET Gel Extractin Kit (#K0692; Thermo Fisher Scientific). Все стандартные манипуляции проводили по соответствующим протоколам [16].

ПЦР

Амплификацию гена *flaA* проводили методом ПЦР с праймерами *fla1f* и *fla-392г* по стандартной методике [17]. Режим проведения реакции: 3 мин при 95°C, 35 циклов [30 с при 95°C, 30 с при 57°C, 1 мин 30 с при 72°C], 5 мин при 72°C.

ПЦР-продукты анализировали методом электрофореза в 1.0%-ном агарозном геле при напряженности электрического поля 5 В/см.

Секвенирование фрагментов ДНК

Секвенирование проводили на автоматическом секвенаторе AE3000 (Applied Biosystems, США) с использованием набора реагентов BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор гена-мишени для разработки метода молекулярного серотипирования

Предварительно мы провели анализ доступных нуклеотидных последовательностей генов, кодирующих флагеллины 5 сероваров бактерий *B. thuringiensis*. Следует заметить, что число этих генов у разных подвидов *B. thuringiensis* может различаться: локусы содержат от 2 до 5 генов, которые, находятся в одном опероне [10, 18]. Для исследований мы выбрали последовательность пер-

Таблица 1. Штаммы *B. thuringiensis* с известной последовательностью гена *flaA*
Table 1. *B. thuringiensis* strains with known *flaA* gene sequence

Вид	Серовар	Название штамма	BV-BRC ID
<i>B. thuringiensis</i>	<i>berliner</i>	Bt407	fig 1434.3.peg.2727
<i>B. thuringiensis</i>	<i>berliner</i>	ATCC 10792	fig 527031.3.peg.3305
<i>B. thuringiensis</i>	<i>israelensis</i>	4Q7	fig 1430.6.peg.1237
<i>B. thuringiensis</i>	<i>israelensis</i>	BGSC 4Q7	fig 1430.37.peg.4411
<i>B. thuringiensis</i>	<i>israelensis</i>	AM65-52	fig 1430.25.peg.1664
<i>B. thuringiensis</i>	<i>israelensis</i>	AR23	fig 1430.39.peg.1619
<i>B. thuringiensis</i>	<i>israelensis</i>	DE0030	fig 1430.33.peg.2512
<i>B. thuringiensis</i>	<i>israelensis</i>	KNU-26	fig 1430.38.peg.13
<i>B. thuringiensis</i>	<i>israelensis</i>	4Q1	fig 1430.23.peg.2820
<i>B. thuringiensis</i>	<i>morrisoni</i>	HD 600	fig 1441.3.peg.4750
<i>B. thuringiensis</i>	<i>morrisoni</i>	4AA1	fig 1461024.5.peg.1737
<i>B. thuringiensis</i>	<i>morrisoni</i>	BGSC 4AA1	fig 1441.4.peg.1753
<i>B. thuringiensis</i>	<i>morrisoni</i>	BGSC 4K1	fig 1441.12.peg.6589
<i>B. thuringiensis</i>	<i>sotto</i>	T04001	fig 527026.3.peg.5562
<i>B. thuringiensis</i>	<i>sotto</i>	NRRL B-18679	fig 29340.4.peg.2698
<i>B. thuringiensis</i>	<i>sotto</i>	BGSC 4E3	fig 29340.3.peg.5908
<i>B. thuringiensis</i>	<i>kurstaki</i>	BGSC 4D4	fig 29339.75.peg.2369
<i>B. thuringiensis</i>	<i>kurstaki</i>	7.1o	fig 29339.74.peg.3515
<i>B. thuringiensis</i>	<i>kurstaki</i>	7.2o	fig 29339.74.peg.3516
<i>B. thuringiensis</i>	<i>kurstaki</i>	7.3o	fig 29339.74.peg.3517

вого гена оперона – *flaA*, – который обнаружен у представителей всех подвигов *B. thuringiensis*, и проанализировали доступные на ресурсе BV-BRC (Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center: <https://www.bv-brc.org/>) нуклеотидные последовательности этого гена для штаммов различных сероваров этого вида бактерий (табл. 1).

В результате проведенного филогенетического анализа выявлено, что последовательности гена *flaA* существенно различаются внутри каждого серовара как по длине, так и по нуклеотидному составу. Так, длина всех проанализированных последовательностей *flaA* серовара *israelensis* составляла 852 п.н. с гомологией 100%, серовара *berliner* – 1146 п.н. с гомологией 100%, серовара *morrisoni* – 1122 п.н. с гомологией 100%, серовара *sotto* – 1104 п.н. с гомологией 100%, серовара *kurstaki* – от 831 до 843 п.н. с гомологией от 92 до 100%. Гомо-

логия между последовательностями этого гена для различных сероваров не превышала 60%.

С помощью программы ClustalW Multiple Sequence Alignment проведено множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей полноразмерных генов *flaA* из штаммов различных сероваров. В результате проведенного анализа была идентифицирована область в пределах первых 400 п.н., консервативная для всех исследуемых штаммов.

Результат выравнивания нуклеотидных последовательности консервативных областей гена *flaA* разных сероваров приведен в табл. 2.

Из представленных данных видно, что гомология нуклеотидных последовательностей консервативных областей гена *flaA* различных сероваров *B. thuringiensis* составляет от 72.7 до 95.15%, тогда как гомология внутри серовара находится в ин-

Таблица 2. Сравнение нуклеотидных последовательностей консервативных областей гена *flaA* разных сероваров *B. thuringiensis*
 Table 2. Comparison of nucleotide sequences of conserved regions of the *flaA* gene of different *B. thuringiensis* serovars

Штамм	Гомология консервативных областей гена <i>flaA</i> , %																		
	ser. <i>kurstaki</i>			ser. <i>israelensis</i>						ser. <i>sofio</i>			ser. <i>berliner</i>			ser. <i>morrisoni</i>			
	7.1o	7.2o	7.3o	4Q1	4Q7	BGSC 4Q7	AM65-52	AR23	DE0030	КНУ-26	BGSC 4E3	T04001	NRRL B-18679	АТСС 10792	Bt407	BGSC 4K1	HD 600	4AA1	BGSC 4AA1
7.1o	100.00	97.70	97.19	71.94	71.94	71.94	71.94	71.94	71.94	71.94	74.49	74.49	75.51	72.70	72.70	72.70	72.70	72.70	72.70
7.2o	97.70	100.00	97.19	73.47	73.47	73.47	73.47	73.47	73.47	73.47	74.74	74.74	76.79	76.79	73.98	73.98	73.98	73.98	73.98
BGSC 4D4	97.19	97.70	100.0	72.96	72.96	72.96	72.96	72.96	72.96	72.96	75.00	75.00	76.79	73.72	73.98	73.98	73.98	73.98	73.98
7.3o	97.19	97.19	99.49	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	75.00	75.00	76.79	76.79	73.98	73.98	74.23	74.23	74.23
4Q1	71.94	73.47	72.96	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	84.95	84.95	85.97	85.97	85.46	85.46	85.71	85.71	85.71
4Q7	71.94	73.47	72.96	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	84.95	84.95	85.97	85.97	85.46	85.46	85.71	85.71	85.71
BGSC 4Q7	71.94	73.47	72.96	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	84.95	84.95	85.97	85.97	85.46	85.46	85.71	85.71	85.71
AM65-52	71.94	73.47	72.96	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	84.95	84.95	85.97	85.97	85.46	85.46	85.71	85.71	85.71
AR23	71.94	73.47	72.96	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	84.95	84.95	85.97	85.97	85.46	85.46	85.71	85.71	85.71
DE0030	71.94	73.47	72.96	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	84.95	84.95	85.97	85.97	85.46	85.46	85.71	85.71	85.71
КНУ-26	71.94	73.47	72.96	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	84.95	84.95	85.97	85.97	85.46	85.46	85.71	85.71	85.71
BGSC 4E3	74.49	74.74	75.00	84.95	84.95	84.95	84.95	84.95	84.95	84.95	100.0	100.0	97.43	85.97	85.97	86.22	86.22	86.22	86.22
T04001	74.49	74.74	75.00	84.95	84.95	84.95	84.95	84.95	84.95	84.95	100.0	100.0	97.43	85.97	85.97	86.22	86.22	86.22	86.22
NRRL B-18679	75.51	76.79	76.79	85.97	85.97	85.97	85.97	85.97	85.97	85.97	97.43	97.43	100.0	88.01	88.01	87.76	87.76	87.76	87.76
АТСС 10792	72.70	73.98	73.98	85.46	85.46	85.46	85.46	85.46	85.46	85.46	85.97	85.97	88.01	100.0	100.0	95.15	95.15	95.15	95.15
Bt407	72.70	73.98	73.98	85.46	85.46	85.46	85.46	85.46	85.46	85.46	85.97	85.97	88.01	100.0	100.0	95.15	95.15	95.15	95.15
BGSC 4K1	72.70	73.98	73.98	85.71	85.71	85.71	85.71	85.71	85.71	85.71	86.22	86.22	87.76	95.15	95.15	100.0	100.0	100.0	100.0
HD 600	72.70	73.98	73.98	85.71	85.71	85.71	85.71	85.71	85.71	85.71	86.22	86.22	87.76	95.15	95.15	100.0	100.0	100.0	100.0
4AA1	72.70	73.98	73.98	85.71	85.71	85.71	85.71	85.71	85.71	85.71	86.22	86.22	87.76	95.15	95.15	100.0	100.0	100.0	100.0
BGSC 4AA1	72.70	73.98	73.98	85.71	85.71	85.71	85.71	85.71	85.71	85.71	86.22	86.22	87.76	95.15	95.15	100.0	100.0	100.0	100.0

тервале 97.19–100.00%. Такая степень гомологии позволяет использовать эту область гена *flaA* для идентификации различных сероваров *B. thuringiensis* – путем сравнения нуклеотидных последовательностей.

Таким образом, выбрана генетическая мишень для разработки метода молекулярного серотипирования штаммов *B. thuringiensis*.

Дизайн универсальных праймеров

На основании нуклеотидных последовательностей консервативных областей гена *flaA* были подобраны универсальные праймеры: *fla1f* и *fla-392r* (табл. 3) – для наработки фрагмента ДНК размером 392 п.н., его секвенирования и последующего молекулярного серотипирования штаммов *B. thuringiensis*.

Метод молекулярного серотипирования штаммов *B. thuringiensis*

На основе теоретического анализа доступных нуклеотидных последовательностей гена *flaA* *B. thuringiensis* пяти серотипов: *sotto*, *kurstaki*, *israelensis*, *berliner* и *morrisoni* – разработан метод молекулярного серотипирования этого вида бактерий. Метод включает следующие этапы:

1. Используя хромосомную ДНК исследуемых штаммов *B. thuringiensis* в качестве матрицы и универсальные праймеры *fla1f* и *fla-392r*, проводят наработку ПЦР-фрагментов консервативной части гена *flaA*.

2. Амплифицированные фрагменты ДНК секвенируют и анализируют нуклеотидную последовательность.

3. Используя биоинформатический анализ, сравнивают целевые нуклеотидные последовательности с таковыми для гена *flaA* известных сероваров *B. thuringiensis*. Критерием отнесения штамма к определенному серовару считается гомология не менее 97%.

Валидация метода молекулярного серотипирования *B. thuringiensis*

Разработанный метод молекулярного серотипирования апробирован на штаммах *B. thuringiensis* из коллекции БРЦ ВКПМ, серовар которых не был известен. В качестве контрольных использовали штаммы известных сероваров: *B. thuringiensis* ser. *berliner* ВКПМ В-9873 (DSM 2046) и *B. thuringiensis* ser. *israelensis* ВКПМ В-5246 (ATCC 35646).

Хромосомная ДНК исследуемых штаммов была использована в качестве матрицы для проведения ПЦР с праймерами *fla1f* и *fla-392r*. Во всех

Таблица 3. Универсальные праймеры для серотипирования штаммов *B. thuringiensis*

Table 3. Universal primers for serotyping *B. thuringiensis* strains

Праймер	Последовательность, 5' → 3'	Длина, п.н.
<i>fla1f</i>	atgagaattaatacaaacatt	21
<i>fla-392r</i>	ttaaactctgtgttttagaaat	23

случаях были наработаны фрагменты ДНК размером 392 п.н. Амплифицированные фрагменты секвенировали. Полученные нуклеотидные последовательности (приведены на рис. S1 Дополнительных материалов) сравнивали с консервативными участками гена *flaA* штаммов *B. thuringiensis* различных сероваров. Результаты приведены в табл. 4.

Согласно результатам сравнительного анализа, нуклеотидный состав консервативных последовательностей гена *flaA* позволяет определить серовар *B. thuringiensis* (табл. 5). Так, штаммы ВКПМ В-3360, В-5689, В-4642, В-3699, В-9873 можно отнести к серовару *berliner*, так как их последовательности на 100% гомологичны штамму *B. thuringiensis* ser. *berliner*, а гомология с другими сероварами не превышает 96%. Штаммы ВКПМ В-4853 и В-4871 относятся к серовару *morrisoni* (гомология 100% с *B. thuringiensis* ser. *morrisoni*); штаммы ВКПМ В-3252 и В-3269 – к серовару *sotto* (гомология 100% с *B. thuringiensis* ser. *sotto*); штамм ВКПМ В-5246 – к серовару *israelensis* (гомология 100% с *B. thuringiensis* ser. *israelensis*); штамм ВКПМ В-3847 – к серовару *kurstaki* (гомология 97.07% *B. thuringiensis* ser. *kurstaki*). Серовары контрольных штаммов ВКПМ В-9873 (DSM 2046) и ВКПМ В-5246 (ATCC 35646), определенные разработанным методом, совпали с результатами серологического анализа.

Таким образом, можно сделать вывод, что разработанный нами метод молекулярного серотипирования штаммов *B. thuringiensis* специфичен. Это подтверждено соответствием полученных результатов с данными серологических методов для контрольных штаммов.

Н-серотипирование по-прежнему остается самым распространенным методом для классификации штаммов *B. thuringiensis*, хотя по сравнению с ним представленный здесь метод имеет важное преимущество: он не ограничен наличием и составом антисывороток. Для таксономической классификации нового штамма *B. thuringiensis* достаточно определить нуклеотидную последовательность консервативной области гена *flaA*, используя пару универсальных праймеров.

Метод молекулярного серотипирования разработан и апробирован на штаммах *B. thuringiensis* сероваров *sotto*, *kurstaki*, *israelensis*, *berliner* и *morrisoni*.

Таблица 4. Сравнение нуклеотидных последовательностей консервативных областей гена *flaA* штаммов *B. thuringiensis* известных сероваров и из коллекции БРЦ ВКПМ
Table 4. Comparison of nucleotide sequences of conserved regions of the *flaA* gene of *B. thuringiensis* strains of known serovars and from the BRC VKPM collection

Штамм	Гомология консервативных областей гена <i>flaA</i> , %															
	ser. <i>kurstaki</i> BGSC 4D4	B-3847	B-5246	ser. <i>sotto</i> BGSC 4E3	B-3252	B-3269	ser. <i>israelensis</i> BGSC 4Q7	B-3360	B-5689	B-4642	B-3699	B-9873	ser. <i>berliner</i> Bt407	ser. <i>morrisoni</i> BGSC 4K1	B-4853	B-4871
BGSC 4D4	100.00	97.07	73.18	79.00	77.78	77.62	77.33	75.55	75.64	75.79	75.89	75.72	77.00	74.58	77.54	77.29
B-3847	97.07	100.00	69.62	76.19	72.91	72.91	75.82	72.33	72.33	72.33	72.33	72.33	72.07	73.33	72.05	72.17
B-5246	73.18	69.62	100.00	86.36	83.62	83.62	100.00	82.59	82.59	82.59	82.59	82.59	82.50	87.27	83.28	83.56
BGSC 4E3	79.00	76.19	86.36	100.00	100.00	100.00	89.00	87.96	88.00	88.42	88.30	88.04	89.00	88.33	89.49	89.38
B-3252	77.78	72.91	83.62	100.00	100.00	100.00	88.17	84.79	84.83	84.87	85.00	84.75	85.84	88.33	85.71	85.80
B-3269	77.62	72.91	83.62	100.00	100.00	100.00	88.09	84.93	85.05	84.79	85.12	84.75	85.76	88.33	85.71	85.80
BGSC 4Q7	77.33	75.82	100.00	89.00	88.17	88.09	100.00	88.69	88.73	89.12	89.01	88.77	89.67	87.92	89.49	89.38
B-3360	75.55	72.33	82.59	87.96	84.79	84.93	88.69	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.0	96.08	95.11	95.07
B-5689	75.64	72.33	82.59	88.00	84.83	85.05	88.73	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.0	96.08	95.13	95.07
B-4642	75.79	72.33	82.59	88.42	84.87	84.79	89.12	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.0	96.08	95.14	95.07
B-3699	75.89	72.33	82.59	88.30	85.00	85.12	89.01	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.0	96.08	95.14	95.07
B-9873	75.72	72.33	82.59	88.04	84.75	84.75	88.77	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.0	96.08	95.14	95.07
Bt407	77.00	72.07	82.50	89.00	85.84	85.76	89.67	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.0	96.08	95.24	95.20
BGSC 4K1	74.58	73.33	87.27	88.33	88.33	88.33	87.92	96.08	96.08	96.08	96.08	96.08	96.08	100.00	100.00	100.00
B-4853	77.54	72.05	83.28	89.49	85.71	85.71	89.49	95.11	95.13	95.14	95.14	95.14	95.24	100.0	100.00	100.00
B-4871	77.29	72.17	83.56	89.38	85.80	85.80	89.38	95.07	95.07	95.07	95.07	95.07	95.20	100.0	100.00	100.00

Таблица 5. Исследованные штаммы *B. thuringiensis* из коллекции БРЦ ВКПМ
Table 5. Investigated strains of *B. thuringiensis* from the BRC VKPM collection

Штамм <i>B. thuringiensis</i> ^a	Серотип	
	серологический метод	молекулярный метод ^b
ВКПМ В-3360	—	<i>berliner</i>
ВКПМ В-3699	—	<i>berliner</i>
ВКПМ В-4642	—	<i>berliner</i>
ВКПМ В-5689	—	<i>berliner</i>
ВКПМ В-9873 (DSM 2046)	<i>berliner</i>	<i>berliner</i>
ВКПМ В-5246 (АТСС 35646)	<i>israelensis</i>	<i>israelensis</i>
ВКПМ В-4853	—	<i>morrisoni</i>
ВКПМ В-4871	—	<i>morrisoni</i>
ВКПМ В-3252	—	<i>sotto</i>
ВКПМ В-3269	—	<i>sotto</i>
ВКПМ В-3847	—	<i>kurstaki</i>

Примечание: ^a Указан номер БРЦ ВКПМ, в скобках приведен номер в других коллекциях. ^b Приведены результаты, полученные с использованием разработанного метода.

Note: ^a The number of the BRC VKPM is indicated; the number in other collections is given in parentheses. ^b The results obtained using the developed method are presented.

soni, возможность его применения для других сероваров *B. thuringiensis* будет установлена в дальнейших исследованиях.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2021-1053) с использованием материалов коллекционного и приборного фондов Биоресурсного центра “Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов” (УНУ БРЦ ВКПМ) НИЦ “Курчатовский институт”.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ МАТЕРИАЛ.

Электронная версия статьи содержит дополнительный материал, доступный безвозмездно на сайте: <https://sciencejournals.ru/journal/biotekh/>.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Herrero S., Bel Y., Hernández-Martínez P., Ferré J.* Susceptibility, mechanisms of response and resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in *Spodoptera* spp. *Curr. Opin. Insect. Sci.*, 2016, 15, 89–96. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2016.04.006>
- Harirchi S., Sar T., Ramezani M., Aliyu H., Etemadifar Z., Nojumi S.A., Yazdian F., Awasthi M.K., Taherzadeh M.J.* *Bacillales*: from taxonomy to biotechnological and industrial perspectives. *Microorganisms*, 2022, 10(12), 2355. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10122355>
- de Barjac H.* Identification of H-serotypes of *Bacillus thuringiensis*. In: *Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970–1980*. Ed. H.D. Burgess. London: Acad. Press, 1981, 35–43.
- Lecadet M.M., Frachon E., Dumanoir V.C., Ripouteau H., Hamon S., Laurent P., Thiéry I.* Updating the H-antigen classification of *Bacillus thuringiensis*. *J. Appl. Microbiol.*, 1999, 86(4), 660–672. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00710.x>
- Zhang M.Y., Lövgren A., Landén R.* Adhesion and cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis* to cultured Spodoptera and Drosophila cells. *J. Invertebr. Pathol.*, 1995, 66(1), 46–51. <https://doi.org/10.1006/jipa.1995.1059>
- Bouillaut L., Ramarao N., Buisson C., Gilois N., Gohar M., Lereclus D., Nielsen-Leroux C.* FlhA influences *Bacillus thuringiensis* PlcR-regulated gene transcription, protein production, and virulence. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005, 71(12), 8903–8310. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.8903-8910.2005>
- Larsen M.V., Cosentino S., Rasmussen S., Friis C., Hasman H., Marvig R.L., Jelsbak L., Sicheritz-Pontén T., Ussery D.W., Aarestrup F.M., Lund O.* Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. *J. Clin. Microbiol.*, 2012, 50, 1355–1361. <https://doi.org/10.1128/JCM.06094-11>
- Wang L., Rothmund D., Curd H., Reeves P.R.* Species-wide variation in the *Escherichia coli* flagellin (H-antigen) gene. *J. Bacteriol.*, 2003, 185, 2936–2943. <https://doi.org/10.1128/JB.185.9.2936-2943.2003>
- Banjo M., Iguchi A., Seto K., Kikuchi T., Harada T., Scheutz F., Iyoda S., Pathogenic E. coli Working Group in Japan.* *Escherichia coli* H-genotyping PCR: a complete and practical platform for molecular H typing. *J. Clin.*

- Microbiol.*, 2018, 56(6), 00190-18.
<https://doi.org/10.1128/JCM.00190-18>
10. Xu D., Côté J.C. Sequence diversity of the *Bacillus thuringiensis* and *B. cereus* sensu lato flagellin (H antigen) protein: comparison with H serotype diversity. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2006, 72(7), 4653–4662.
<https://doi.org/10.1128/AEM.00328-06>
 11. Machado J., Grimont F., Grimont P.A.D. Identification of *Escherichia coli* flagellar types by restriction of the amplified *fliC* gene. *Res. Microbiol.*, 2000, 151, 535–546.
[https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(00\)00223-0](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(00)00223-0)
 12. Gaviria Rivera A.M., Priest F.G. Molecular typing of *Bacillus thuringiensis* serovars by RAPD-PCR. *Syst. Appl. Microbiol.*, 2003, 26(2), 254–261.
<https://doi.org/10.1078/072320203322346100>
 13. Soufiane B., Xu D., Côté J.C. Flagellin (FliC) protein sequence diversity among *Bacillus thuringiensis* does not correlate with H serotype diversity. *Antonie Van Leeuwenhoek.*, 2007, 92(4), 449–461.
<https://doi.org/10.1007/s10482-007-9173-3>
 14. Xu D., Côté J.C. Sequence diversity of *Bacillus thuringiensis* flagellin (H antigen) protein at the intra-H serotype level. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2008, 74(17), 5524–5532.
<https://doi.org/10.1128/AEM.00951-08>
 15. Wang K., Shu C., Soberón M., Bravo A., Zhang J. Systematic characterization of *Bacillus* Genetic Stock Center *Bacillus thuringiensis* strains using Multi-Locus Sequence Typing. *J. Invertebr. Pathol.*, 2018, 155, 5–13.
<https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.04.009>
 16. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edition. Plainview, N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989, 1626 p.
 17. Saiki R.K. Amplification of genomic DNA. In: *PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications*. Eds M. Innis, D. Gelfand, J. Sninsky, T. White. London: Acad. Press, 1990, 14–15.
[https://doi.org/10.1016/0307-4412\(91\)90165-5](https://doi.org/10.1016/0307-4412(91)90165-5)
 18. Houry A., Briandet R., Aymerich S., Gohar M. Involvement of motility and flagella in *Bacillus cereus* biofilm formation. *Microbiology (Reading)*, 2010, 156(4), 1009–1018.
<https://doi.org/10.1099/mic.0.034827-0>

Molecular Serotyping of *Bacillus thuringiensis*

E. V. Patrusheva^{a, #}, L. N. Borshchevskaya^a, A. A. Kanikovskaya^a, and S. P. Sineoky^a

^aNational Bioresource Center “Russian National Collection of Industrial Microorganisms”,
Scientific Center “Kurchatov Institute”, Moscow, 123182 Russia

[#]e-mail: lpatrush@gmail.com

Abstract—A method for molecular serotyping of *Bacillus thuringiensis* strains has been developed. It is based on comparison of nucleotide sequences of conserved regions of the *flaA* gene in five *B. thuringiensis* serovars: *sotto*, *kurstaki*, *israilensis*, *berliner*, and *morrisoni*. For amplification of the target DNA fragment, a set of primers universal for all studied serovars of *B. thuringiensis* was designed. For assigning a strain to a particular serovar, a new algorithm based on the degree of homology of the conserved *flaA* region was developed. Validation of the method was carried out on 11 strains of *B. thuringiensis* from the collection of the National Bioresource Center “Russian National Collection of Industrial Microorganisms” (VKPM). The results obtained by molecular serotyping fully coincided with the data of serologic methods.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, serovar, taxonomic identification, primer, *flaA*, flagellin