

УДК 579.832/833:577.212.3:277.217:279.64

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ГЕНОМА БАКТЕРИЙ *Bacillus velezensis* БИМ В-439Д

© 2019 г. А. В. Бережная¹, *, О. В. Евдокимова¹, Л. Н. Валентович¹,
Н. В. Сверчкова¹, М. А. Титок¹, Э. И. Коломиец¹

¹Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, 220141 Беларусь

*e-mail: anastasiya1981@bk.ru

Поступила в редакцию 09.10.2018 г.

После доработки 10.01.2019 г.

Принята к публикации 20.02.2019 г.

В результате полногеномного секвенирования бактерий *Bacillus velezensis* БИМ В-439Д было установлено, что их геном представлен одной кольцевой хромосомой размером 3978954 п.н. и содержит 3969 предсказанных генов. В хромосоме выявлено 10 консервативных локусов, определяющих продукцию антимикробных соединений разной химической природы: липопептиды (сурфактин, бацилломицин, фенгицин), поликетиды (бациллен, диффицидин/оксидиффицидин, макролактин), сидерофор бациллибактин, дипептид бацилизин, белок/поликетид неопределенного состава и бактериоцин амилоциклицин. Методом направленного мутагенеза получены мутанты с нарушенным синтезом сурфактина, отличающиеся повышенным образованием бацилломицина и фенгицина. При этом мутанты демонстрировали высокую антимикробную активность в отношении ряда бактериальных и грибных патогенов (*Penicillium expansum*, *Alternaria tenuis*, *Botrytis cinerea*, *Bipolaris sorokiniana*), но в меньшей степени подавляли рост грибов рода *Fusarium*.

Ключевые слова: *Bacillus velezensis*, геном, антимикробные соединения, антагонизм, сурфактин

DOI: 10.1134/S0555109919040032

Отличительной особенностью филогенетически близких бактерий *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* и *Bacillus velezensis* является способность вступать в плотный контакт с корневой системой растений и продуцировать широкий спектр биологически активных соединений, обеспечивающих подавление патогенов и стимулирующих рост и развитие растения [1]. В геноме микроорганизмов данной таксономической группы присутствует большое число хромосомных локусов, определяющих синтез антимикробных соединений разной химической природы, образование которых в клетке происходит без участия рибосом. Это липопептиды (сурфактин, фенгицин и бацилломицин), поликетиды (макролактин, бациллен, диффицидин/оксидиффицидин), дипептид бацилизин и сидерофор бациллибактин. Помимо этого, отдельные представители *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* и *Bacillus velezensis* способны синтезировать полипептид/поликетид с неизвестным химическим составом, а также бактериоцины [2]. Благодаря способности подавлять широкий круг патогенов (бактерии, грибы, вирусы) данные бактерии применяются в качестве основы безопасных для окружающей среды биопре-

паратов при получении сельскохозяйственной продукции. В хозяйствах Республики Беларусь широко используется созданный на основе бактерий *B. velezensis* БИМ В-439Д зарегистрированный биопестицид Бетапротектин, эффективно снижающий поражение сахарной и столовой свеклы кагатной гнилью, огурцов и томатов прикорневой гнилью, сосны обыкновенной диплодиозом (<http://mbio.bas-net.by/prod/betaprotectin/>).

В настоящее время для детального изучения практически важных микроорганизмов широко используется метод полногеномного секвенирования. Данная технология позволяет в полной мере оценить генетический потенциал организма, научно обосновать его биологическую безопасность и создать исчерпывающий генетический паспорт для коммерческого использования, а также заложить основу для изучения тонких молекулярно-генетических механизмов, определяющих практически важные свойства.

Имея полногеномную последовательность, можно с помощью сравнения с уже аннотированными геномами хорошо изученных штаммов отобрать ряд генетических детерминант, предположительно участвующих в исследуемом про-

цессе и оценить их роль. Одним из методов функциональной геномики является направленный мутагенез и анализ фенотипа получившихся мутантов. Инсерционные мутанты, у которых нарушен синтез определенных метаболитов, позволяют продемонстрировать роль этих соединений в формировании антагонистической активности штамма.

Цель работы — молекулярно-генетический анализ генома бактерий *B. velezensis* БИМ В-439Д, обладающих выраженным антагонизмом к широкому спектру патогенных грибов и бактерий и стимулирующих рост культурных растений, а также оценка роли сурфактина в проявлении антагонистических свойств штамма.

МЕТОДИКА

Штаммы микроорганизмов. В работе использовали штамм спорообразующих бактерий *B. velezensis* БИМ В-439Д (ранее определен как *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*), выделенный из образца дерново-подзолистой почвы на территории Минской области и использующийся в качестве основы зарегистрированного биопрепарата Бетапротектин; коммерческие штаммы *Escherichia coli* XL1-Blue [3], *E. coli* GM2163 [4], и коллекционные плазмиды pUC19 [5], pMTL21E [6], а также штаммы фитопатогенных бактерий *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* БИМ В-695, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* БИМ В-634, *Agrobacterium tumefaciens* 8628 и фитопатогенных грибов *Penicillium expansum* БИМ F-564, *Alternaria tenuis* БИМ F-460, *Fusarium graminearum* БИМ F-601, *Fusarium oxysporum* БИМ F-381, *Fusarium culmorum* БИМ F-459 и *Fusarium avenaceum* БИМ F-458, *Botrytis cinerea* БИМ F-383, *Bipolaris sorokiniana* БИМ F-464, *Phoma betae* БИМ F-461 из Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов Института микробиологии НАН Беларуси.

Среды и растворы. Для выращивания бактерий использовали среды LB и Мейнелла [7], фитопатогенных грибов — картофельно-глюкозную среду [8]. Агаризованные среды содержали 1.2 или 2% агар-агара. Коммерческие препараты антибиотиков ампициллина и/или эритромицина применяли в концентрации 100 мкг/мл.

Методы исследований. Тотальную ДНК выделяли с помощью набора реактивов Bacteria DNA Preparation Kit “Jena Bioscience GmbH” (Германия). Плазмидную ДНК выделяли с использованием набора реактивов GeneJET Plasmid Miniprep “Thermo Fisher Scientific” (США).

Для полимеразной цепной реакции (ПЦР) использовали реактивы фирмы “Thermo Fisher Scientific” (США).

Реакционная смесь (50 мкл), содержала 100 нг ДНК матрицы, дНТФ (0.2 ммоль/л каждого нуклеотида), 1.5 ммоль/л $MgCl_2$, 0.2 мкмоль/л каждого праймера, 0.5 ед. *Pfu*-полимеразы и соответствующий буфер (1x). Амплификацию фрагмента гена *srfA4* проводили в режиме: 95°C — 5 мин (1 цикл); 95°C — 30 с, 57°C — 30 с, 72°C — 2.5 мин (30 циклов); 72°C — 10 мин (1 цикл). Для амплификации фрагментов генов *baeB*, *dfnA*, *mlnA*, *fenA*, *bmyD*, *dhbA* проводили ПЦР по аналогичному протоколу, за исключением температуры отжига праймеров (54–56°C). Список используемых праймеров производства “Праймтех” (Беларусь) приведен в табл. 1. Продукты ПЦР очищали из геля с использованием набора реактивов Min-Elute PCR Purification Kit “Qiagen” (Германия).

Рестриктазы *Sma*I, *Eco*RI и ДНК-лигазу фага T4 производства “Thermo Fisher Scientific” (США) использовали в соответствии с рекомендациями фирмы изготовителя.

Трансформацию бактерий *E. coli* и *B. velezensis* БИМ В-439Д осуществляли согласно методикам, изложенным в публикациях [9, 10].

Для постановки секвенирующей реакции по Сэнгеру (определение последовательностей отдельных генетических детерминант) использовали набор DNA Cycle Sequencing Kit “Jena Bioscience GmbH” (Германия) и стандартные праймеры M13 Forward, M13 Reverse “Праймтех” (Беларусь). Продукты секвенирующей реакции детектировали с помощью автоматического секвенатора 4300 DNA Analyzer, “Li-COR” (США). Полученные результаты анализировали с помощью программ eSeq Version 3.1 “Li-COR” (США), BLASTN2.2.1 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) и базы данных ГенБанк (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

Подготовку библиотеки ДНК для полногеномного секвенирования осуществляли с помощью набора Nextera XT “Illumina” (США). Определение нуклеотидных последовательностей проводили на приборе MiSeq “Illumina” (США), используя комплект реактивов MiSeq Reagent Kit v3 (600-cycle) (США). Адаптерные и недостоверные последовательности удаляли с помощью программы Trimmomatic-0.38 (<https://academic.oup.com/bioinformatics/article/30/15/2114/2390096>).

Отобранные парноконцевые последовательности размером от 50 и до 300 п.н. собирали в контиги с помощью программы SPAdes-3.11.1 (<http://spades.bioinf.spbau.ru/release3.11.1/manual.html>). Полученные контиги объединяли в хромосомную последовательность используя для сравнения доступные геномы наиболее близкородственных

Таблица 1. Праймеры, использованные в работе

Ген, продукт, синтез которого детерминируется локусом, содержащим данный ген	Нуклеотидная последовательность праймеров	Длина ПЦР-продукта, п. н.
<i>baeB</i> , бациллен	Fbae TGGTGTCTCATCTGGTAAAGTGG Rbae ACTCAGCCATTTCATCACCAG	860
<i>dhbA</i> , бациллибактин	Fbaci TGACTGCGTGTTTTGATTTGG Rbaci AACGCATAAATCATGCATCG	846
<i>bmyD</i> , бацилломицин	Fbac GCAGGAAGGTGTAACAATGG Rbac TCCTTGTTGCGGAAATGTCC	723
<i>dfnA</i> , диффицидин/оксидиффицидин	Fdif AGATGCTTACGTTTGTGTTC RdifAGCAGTATCAGACTCTTCTTTCG	887
<i>fenA</i> , фенгицин	Ffen AACTCACGCACAAAGAAGAG Rfen ACAAAGGACAGGAACCTCTGC	903
<i>mlnA</i> , макролактин	FmacACATAAAACCAATCGTTGTTTCG Rmac TGTCCCATTAGATACCTGATGC	1077
<i>srfaA</i> , сурфактин	FsrfTTGAGAAAGCGATACAGGAATTCG RsrfTCGCATCTTCAATCAGCGTGATC	1131

штаммов — Bs-916 (CP009611) и TrigoCor1448 (CP007244). Предварительную аннотацию генома проводили с помощью системы RAST 2.0 и PROKKA 1.12. Поиск профаговых последовательностей осуществлялся с помощью веб-сервиса PHASTER (<http://phaster.ca/>). Подсчет средней нуклеотидной идентичности (ANI — Average Nucleotide Identity) осуществлялся с помощью веб-сервиса JSpeciesWS (<http://jspecies.ribohost.com/jspeciesws/>) [11].

Направленный мутагенез бактерий *B. velezensis* БИМ В-439Д проводили с использованием суицидальной плазмиды pMTL21E, в EcoRI-сайт которой был встроен EcoRI-фрагмент гена *srfaA* размером 774 п.н., вырезанный из плазмиды pUC19:: *srfaA* (ПЦР-продукт гена *srfaA* размером 1131 п.н., встроенный в SmaI-сайт плазмиды pUC19, содержал два сайта для рестриктазы EcoRI, что было установлено в результате секвенирования). Полученную гибридную плазмиду pMTL21E:: *srfaA* клонировали в клетках штамма *E. coli* GM2163 для деметилирования, затем выделяли и внедряли в клетки бактерий *B. velezensis* БИМ В-439Д путем химической трансформации. Трансформантов отбирали на селективной среде с эритромицином, выделяли тотальную ДНК и проверяли наличие вставки в гене *srfaA* методом ПЦР.

Липопептиды из культуральной жидкости (КЖ) исходных и мутантных бактерий экстрагировали по методике, описанной в работе [12]. Получен-

ный экстракт выпаривали, осадок растворяли в ацетонитриле.

Анализ содержания липопептидов проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на приборе Agilent 1260 Infinity “Agilent Technologies” (США) с гибридным квадрупольно-времяпролетным масс-спектрометром высокого разрешения Accurate Mass Q-TOF 6530 “Agilent Technologies” (США). Разделение компонентов осуществляли на колонке Zorbax Eclipse Plus C18 50 × 2.1 мм “Agilent Technologies” (США). Анализ проводили в режиме градиентного элюирования, в качестве подвижной фазы использовали подкисленную с помощью муравьиной кислоты (0.1%) воду (раствор А) и ацетонитрил с 0.1%-ной муравьиной кислотой (раствор В). Линейный градиент включал: 0 мин — 30%-ный раствор В; 0.01–0.75 мин повышение концентрации раствора В до 65%; 0.75–10.0 мин повышение концентрации раствора В до 100%, 10–14 мин 100% раствор В; 14.0–15.1 мин снижение концентрации раствора В до 30%; 15.1–18.0 мин уравнивание колонки 30%-ным раствором В. Объем инъекции 1 мкл, скорость потока 0.4 мл/мин. Сурфактин в экстракте КЖ определяли относительно по времени удерживания и масс-спектру коммерческого стандарта сурфактина S3523 “Sigma-Aldrich” (Германия). Для определения фенгицина и бацилломицина использовали данные масс-спектров, приведенные в работе [13].

Антагонистическую активность определяли методом лунок [14], для анализа использовали су-

пернатант КЖ бактерий после фильтрования через фильтр с диаметром пор 0.2 мкм, в контрольных вариантах — стерильную воду.

Для сравнения отдельных генетических локусов использовали веб-ресурс antiSMASH (<https://antismash.secondarymetabolites.org>). Для сравнения геномов использовали программу Mauve (v. 20150226) [15]. Рисунки генетических локусов создавали с помощью веб-сервиса Gene Graphics (<https://kat-labs.cc/genegraphics/>).

Статистическую обработку данных проводили по стандартным методикам в программе LibreOffice Calc (версия: 6.1.3.2).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ общей структуры генома бактерий *B. velezensis* БИМ В-439Д в сравнении с изученными в этом отношении микроорганизмами позволил установить характерные особенности, свойственные микроорганизмам данной систематической группы, а также выявить отличительные особенности исследуемого штамма. Следует отметить, что на декабрь 2018 г. в свободном доступе ГенБанка NCBI депонированы полные нуклеотидные последовательности 56 геномов *B. velezensis*, 22 генома *B. amyloliquefaciens* и значительное число близких к ним представителей рода *Bacillus*. Такой объем доступной научной информации позволяет детально проанализировать полученные в результате секвенирования данные, а также свидетельствует о большом научном интересе, проявляемом в мире к бактериям данной систематической группы.

До проведения полногеномного секвенирования был осуществлен частичный сиквенс-анализ отдельных генетических детерминант (определены фрагменты генов 16S рРНК и гена *gyrA*), позволившие идентифицировать исследуемые бактерии как *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*. Следует отметить, что точную таксономическую принадлежность данного штамма (до уровня подвида) удалось установить только на основании нуклеотидной последовательности гена *gyrA*, поскольку гены 16S рРНК у целого ряда представителей рода *Bacillus* практически идентичны (в частности, *B. subtilis* subsp. *subtilis*, *B. siamensis*, *B. vanillea*, *B. velezensis*, *B. methylotrophicus*, *B. amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* и *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*) [16]. Следовательно, при отсутствии полной геномной последовательности, ген *gyrA* может использоваться в качестве молекулярно-генетического маркера для идентификации данных микроорганизмов. Согласно литературным данным, подвиды *amyloliquefaciens* и *plantarum* вида *B. amyloliquefaciens* отличаются между собой по ряду

свойств. Например, только в геномах бактерий подвида *plantarum* выявлены локусы, определяющие синтез поликетидных антибиотиков макролактана и диффицидина/оскидиффицидина [17–19]. Кроме того, характерной особенностью бактерий *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* является способность колонизировать корни растений. Вступая в плотный контакт с растением, данные микроорганизмы способны обеспечивать его эффективную защиту от патогенов и активно влиять на его рост и развитие [20]. Подобные свойства характерны и для бактерий вида *B. velezensis*. Представителей этих двух таксономических групп в англоязычной литературе обозначают как “связанные с растением бактерии” (plant-associated bacterium). На основании анализа геномов и физиолого-биохимических особенностей бактерии *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* и *B. velezensis* не так давно были объединены в один вид *B. velezensis* [21]. Тем не менее, в литературе до сих пор ряд штаммов обозначают как *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*. При этом необходимо подразумевать их филогенетическое единство с бактериями *B. velezensis*.

Сравнительный анализ геномов типичных представителей вида *B. velezensis* и исследуемых бактерий позволил установить сходство в структурной организации их генетического материала в целом и отдельных генетических детерминант (рис. 1), что указывало на их близкое филогенетическое родство и принадлежность к одной систематической группе. Средняя нуклеотидная идентичность (ANIb) со штаммами G341 (CP011686), FZB42 (CP000560.1), AS43.3 (CP003838.1) составляла соответственно 99.19, 98.74 и 98.69%. Геном бактерий *B. velezensis* БИМ В-439Д по результатам сиквенс-анализа был депонирован в базу GenBank NCBI под номером CP032144. Определено, что геном представлен одной кольцевой хромосомой размером 3978954 п.н., содержащей 46.5% Г/Ц-пар и включающей 3 969 предсказанных генов, в том числе — 3769 белок-кодирующих последовательностей, 27 рРНК, 86 тРНК и 82 псевдогена (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/CP032144>). При этом гены, кодирующие рибосомные РНК, как правило, расположены кластерами (5S, 16S, 23S). В хромосоме бактерий *B. velezensis* (например, штамм G341) и *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* (например, штамм UCMB5033, HG328253) встречается до 10 кластеров генов, кодирующих рРНК. В хромосоме исследуемых бактерий присутствовало 9 генетических локусов, определяющих синтез рРНК. Практически для всех бактерий этой таксономической группы характерно большое число генов, кодирующих синтез тРНК. Их количество варьирует от 51 у штамма *B. velezensis* SB1216 (CP015417) до 95 у штамма *B. velezensis* G341

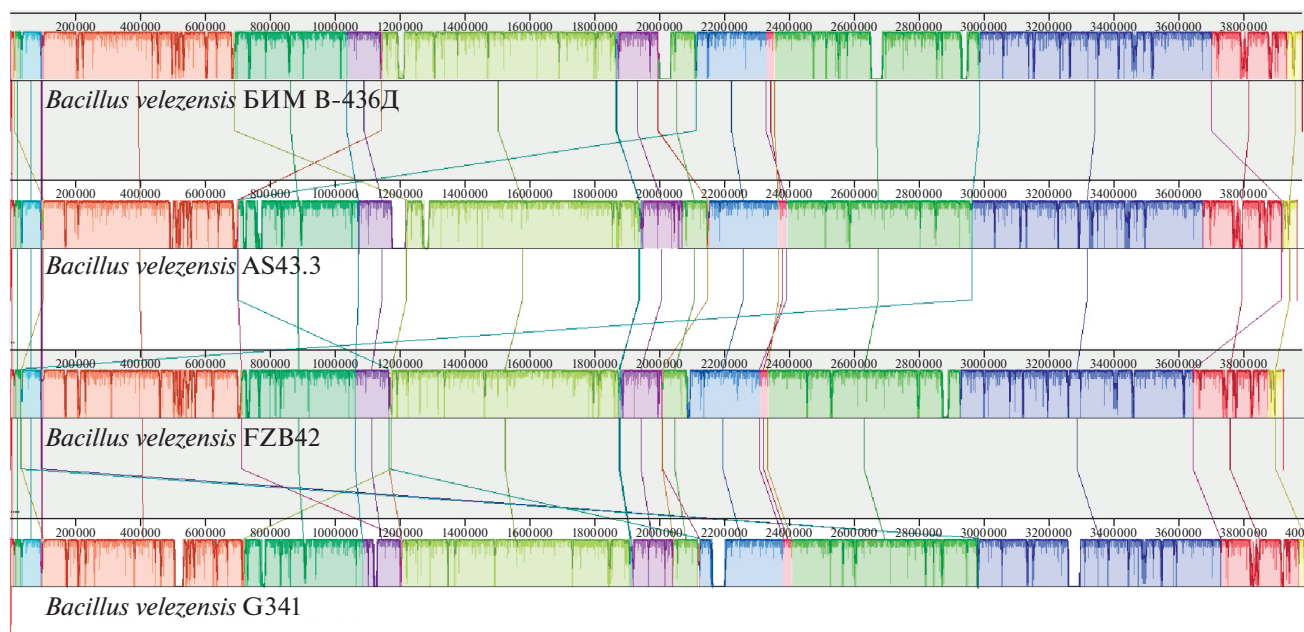


Рис. 1. Сравнительный анализ геномов бактерий *B. velezensis* БИМ В-439Д и *B. velezensis*. Идентичные локусы обозначены одинаковым цветом. Пики внутри локусов показывают степень идентичности расположенных в них генов. Пробегами обозначены уникальные локусы.

(CP011686). Анализируемый штамм БИМ-439 содержал 86 генов, детерминирующих синтез тРНК. Следует отметить, что такое большое содержание в клетке компонентов аппарата трансляции является характерной особенностью целого ряда бактерий, природной средой обитания которых являются почвенные экосистемы [22]. Данные RAST-анализа генома *B. velezensis* БИМ В-439Д в сравнении с известными представителями этой группы бактерий показали, что в составе хромосомы исследуемых бактерий содержалось большое количество генетических детерминант, определяющих метаболизм углеводов, аминокислот, белков, жирных кислот, липидов, изопреноидов, а также синтез кофакторов, витаминов, простетических групп и пигментов (табл. 2). Это вполне закономерно, поскольку данные бактерии продуцируют без участия рибосом широкий спектр антибиотикоподобных соединений, для синтеза которых требуется активный углеводный обмен, в ходе которого образуется ключевые субстраты. Среди множества синтезируемых белков важную роль играют ферменты, определяющие поступление в клетку сахаров и этапы их окисления (пермеазы, гидролазы). В результате этих процессов образуются, в частности, пируват, 2-оксо-глутарат, оксалоацетат и ацетил-КоА, которые являются предшественниками синтеза аминокислот, жирных кислот, поликетидов и целого ряда других жизненно важных метаболитов.

Следует отметить, что присутствующий в геноме исследуемых бактерий ген *sacA*, кодирующий фермент сахарозо-6-фосфатгидролазу, участвующий в первичном расщеплении сахаров, полностью идентичен таковым представителей *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* и *B. velezensis*.

Отличительные особенности организации генетического аппарата исследуемых бактерий были выявлены при анализе мобильных генетических элементов (IS-элементы и профаги). В их хромосоме присутствовали два варианта инсерционных элементов семейства IS3: 6 копий варианта IS150A (1285 п.н.) и 6 копий IS150B (1284 п.н.), отличающихся между собой заменами, вставками и делециями отдельных нуклеотидов, затрагивающими порядка 130 позиций. При этом, все обнаруженные IS-последовательности локализованы между генами, не нарушая открытых рамок считывания. Следует отметить, что подобного типа мобильные элементы встречаются в геномах бактерий *B. amyloliquefaciens* и *B. velezensis* [18, 19]. В частности, в хромосоме штамма *B. velezensis* G341 (выделен из 4-летних корней женьшеня в Корее) присутствует 10 копий IS150A и 4 копии IS150B, а в хромосоме *B. velezensis* FZB42 (выделен из зараженной патогенами почвы в Германии) обнаружено 3 копии только IS150A. В тоже время штамм *B. amyloliquefaciens* Y2, изолированный из ризосферы пшеницы в Китае, вообще их не содержит. Помимо IS-элементов в геноме бактерий

Таблица 2. Сравнительный анализ систем клеточного метаболизма бактерий *B. velezensis* БИМ-439Д

Системы метаболизма	Содержание генов в детерминантах штаммов					
	БИМ В-439Д		FZB42*		GH1-13*	
	всего	%	всего	%	всего	%
Метаболизм белка	182	6.79	166	6.07	196	7.18
Метаболизм углеводов	414	15.45	423	15.46	413	15.13
Метаболизм аминокислот и их производных	438	16.34	437	15.97	439	16.10
Метаболизм нуклеозидов и нуклеотидов	117	4.37	122	4.46	121	4.43
Метаболизм жирных кислот, липидов, изопреноидов	138	5.15	141	5.15	141	5.16
Метаболизм ароматических соединений	12	0.45	13	0.48	12	0.44
Метаболизм РНК	158	5.90	159	5.81	155	5.68
Метаболизм ДНК	79	2.95	112	4.09	98	3.59
Метаболизм серы	39	1.45	39	1.42	43	1.57
Метаболизм фосфора	29	1.08	31	1.13	31	1.13
Метаболизм азота	31	1.16	31	1.13	29	1.06
Системы, определяющие баланс калия	10	0.38	10	0.37	9	0.33
Поступление железа в клетку	29	1.08	31	1.13	29	1.06
Синтез кофакторов, витаминов, простетических групп, пигментов	233	8.69	241	8.81	230	8.42
Клеточное деление и клеточный цикл	53	1.98	52	1.90	54	1.98
Подвижность и хемотаксис	88	3.28	87	3.18	87	3.19
Регуляция и сигнальные системы	61	2.28	58	1.12	63	2.31
Вторичный метаболизм	5	0.19	12	0.44	5	0.18
Состояние покоя и споруляции	116	4.33	126	4.61	119	4.36
Процессы дыхания	75	2.80	73	2.67	74	2.71
Ответ на стрессовые факторы	107	3.99	106	3.87	112	4.10
Системы транспорта через клеточную мембрану	72	2.69	70	2.56	69	2.53
Клеточная стенка, синтез капсулы	133	4.96	131	4.81	136	4.98
Клеточная защита	61	2.28	65	2.38	65	2.38
Всего	2 680	100	2 736	100	2 730	100

B. velezensis БИМ В-439Д обнаружено 3 профага: два полноразмерных (интактных) и один дефектный. Один из полноразмерных профагов размером 37558 п.н. (координаты в геноме 1995476–2033033), предположительно относящийся к порядку *Caudovirales*, не выявлялся в геномах близкородственных *B. velezensis* и *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*, однако обнаруживается в хромосомах некоторых других представителей подвида *B. amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* [17]. Последовательность встроенного фага содержала 37% Г/Ц-пар, что практически на 10% меньше, чем в

хромосоме клетки хозяина – это свидетельствует в пользу того, что его интеграция в хромосому произошла относительно недавно. Второй интактный вирус размером 37592 п.н. (координаты 2647315–2684906) по Г/Ц-составу практически не отличался от такового клетки хозяина и отдельные участки его генома встречались в хромосомах бактерий рода *Bacillus*. Нуклеотидная последовательность еще одного дефектного профага размером 31632 п.н. (координаты 1183850–1215481) также присутствовала в хромосомах бактерий *B. amyloliquefaciens* КНГ19, *B. velezensis* (штаммы

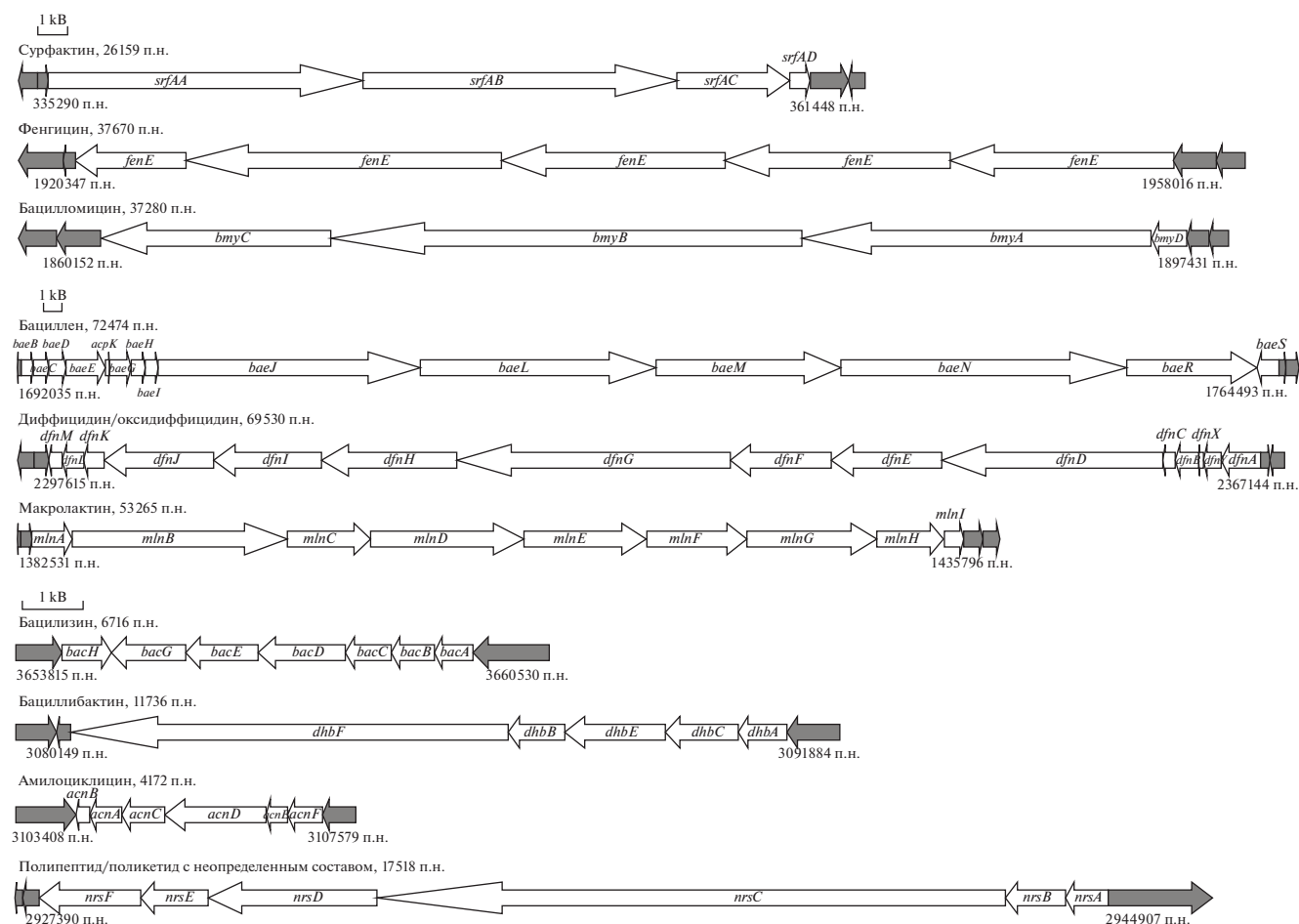


Рис. 2. Генетические карты хромосомных локусов бактерий *B. velezensis* БИМ В-439Д, определяющих синтез антимикробных метаболитов. Рядом с названием метаболита указан размер локуса. Светлые стрелки — гены, входящие в состав локуса, серые стрелки — гены, примыкающие к локусам. Направление стрелок соответствует направлению транскрипции. Внутри стрелок указаны названия генов. Цифры по краям локусов обозначают их координаты в геноме.

СМТ-6 и NJN-6) и *B. subtilis* В-1. Следует отметить, что в хромосомах практически всех бактерий содержатся интактные или дефектные вирусные геномы, наличие которых свидетельствует о происходящих процессах горизонтального переноса. В тоже время присутствие фагов в составе бактериальной хромосомы может иметь и функциональное значение, в частности, защищать клетку от проникновения других подобных вирусов, свободно циркулирующих во внешней среде.

В хромосоме бактерий *B. velezensis* БИМ В-439Д выявлено присутствие характерных для представителей этой таксономической группы протяженных локусов, определяющих синтез полифункциональных ферментных комплексов, ключевыми из которых являются, нерибосомные пептидсинтазы (NRPS) и поликетидсинтазы (PKS). Данные сложно организованные белковые молекулы обеспечивают без участия рибосом образование в клетке циклических липопептидов (сурфактин, бацилло-

мицин, фенгицин), поликетидов (бациллин, диффицидин, макролактин), а также дипептида бацилизина и сидерофора бациллибактина, обладающих антимикробными свойствами (рис. 2, табл. 3). Выявленные генетические кластеры являются высоко консервативными и, несмотря на большие размеры, сходны по нуклеотидному составу таковым бактерий *B. velezensis* и *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* (идентичность составляла не менее 99%) [20, 23]. Кроме того, данные локусы имеют одинаковое генетическое окружение в хромосомах разных штаммов, что указывает на единство их происхождения и отсутствие рекомбинационных процессов, приводящих к изменению их локализации в геномах. Исключение составил ген *bmyB*, детерминирующий синтез В-субъединицы нерибосомной пептидсинтазы, участвующей в образовании бацилломицина. Нуклеотидная последовательность данной генетической детерминанты размером 16122 п.н., кодирует фермент, значи-

Таблица 3. Характеристика хромосомных локусов бактерий *B. velezensis* БИМ В-439Д, определяющих синтез антимикробных метаболитов

Метаболит	Гены, входящие в состав локуса	Координаты локуса в геноме	Размер локуса, п.н.	Сходство с гомологичными локусами бактерий*			Химическая природа метаболита	Уникальность локуса для бактерий <i>B. velezensis</i>	Подавляет развитие
				штамм	№ в Генбанке NCBI	%			
Сурфактин	<i>srfABCD</i>	335 290–361 448	26159	<i>B. velezensis</i> G341	CP011686.1	99	Липопептид	Характерен для бактерий рода <i>Bacillus</i>	Грибы, бактерии
Бацилломицин	<i>bmyDABC</i>	1860152–1897431	37280	<i>B. velezensis</i> OSY-S3	CP024706.1	99	Липопептид	Уникален	Грибы
Фенгизин	<i>fenABCDE</i>	1920 347–1958016	37670	<i>B. velezensis</i> BS-37	CP023414.1	99	Липопептид	Уникален	Грибы
Бациллен	<i>baeBCDE, acrk, baeGHIJLMNRS</i>	1692035–1764493	72474	<i>B. velezensis</i> G341	CP011686.1	99	Поликетид	Характерен для рода <i>Bacillus</i>	Бактерии
Диффицилин	<i>dfnAXYZBCDEF-GHIJKL</i>	2297615–2367144	69530	<i>B. velezensis</i> BS-37	CP023414.1	99	Поликетид	Уникален	Бактерии
Макролактин	<i>mlnABCDEFGHI</i>	1382531–1435796	53265	<i>B. velezensis</i> BS-37	CP023414.1	99	Поликетид	Уникален	Бактерии
Соединение с неопределенным составом, NRS	<i>nrsABCDEF</i>	2927390–2944907	17518	<i>B. velezensis</i> BS-37 <i>B. velezensis</i> FZB42 <i>B. amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> CC178	CP023414.1 CP000560.1 CP006845.1	99	Предпологаемый пептид/поликетид, сидерофор	Уникален	Грибы, бактерии
Бациллибактин	<i>dhbACEBF</i>	3080149–3091884	11736	<i>B. velezensis</i> G341	CP011686.1	99	Сидерофор	Характерен для рода <i>Bacillus</i>	Грибы, бактерии
Бацилизин	<i>bacABCDEGH</i>	3653815–3660530	6716	<i>B. velezensis</i> G341	CP011686.1	99	Дипептид	Характерен для рода <i>Bacillus</i>	бактерии
Амилоциклин	<i>acnBACDEF</i>	3103408–3107579	4172	<i>B. amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> UCMB5113	HG328254.1	99	Циклический пептид, бактериоциин	Уникален	Грам+ бактерии

* 99%-ная идентичность характерна для многих штаммов *B. velezensis*/*B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*, в таблице приведен только один из штаммов.

тельно отличающийся от многих представителей *B. velezensis* аминокислотным составом функционального домена (3267–3777 аминокислотные остатки), определяющего аденилирование субстрата (сходство не превышает 48%).

Локусы, определяющие синтез сурфактина, бациллена, бацилизина и бациллибактина, присутствуют не только в геномах бактерий *B. velezensis* и *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*, но и в хромосомах других видов рода *Bacillus* (например, *B. amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* и *B. subtilis*). В геноме бактерий *B. subtilis* 168 присутствует также сходным образом организованный генетический кластер, определяющий синтез фенгигина (*ppsABCDE*), однако данный метаболит не синтезируется в клетках этих бактерий, в связи с отсутствием гена *sfp*, продукт которого необходим для экспрессии всех вышеуказанных соединений за исключением бацилизина [19]. Бактерии *B. amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* (к примеру, штаммы DSM7; S23; ATCC 15841) также не синтезируют фенгигин, поскольку данный кластер является неполным и представлен в хромосоме только двумя генетическими детерминантами (*fenDE*). В тоже время, хромосомные локусы, определяющие синтез макролактин и диффицидина являющиеся видоспецифичными и характерны только для бактерий *B. velezensis* и *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*.

Как указывалось выше, для экспрессии генов, определяющих синтез липопептидов, поликетидов, сидерофора бациллибактина, необходимо присутствие 4'-фосфопантетеинилтрансферазы, продукта гена *sfp*. Данный фермент, обладая несколькими функциональными активностями, необходим на стадии инициации синтеза вышеуказанных метаболитов, а также обеспечивает их превращение в активную форму после завершения синтеза [19]. Этот ген (675 п.н.) присутствует в геноме бактерий *B. velezensis* БИМ В-439Д и имеет сходную с другими представителями этой таксономической группы локализацию (за *srf*-опероном, координаты 365837–366511). Данная детерминанта полностью идентична нуклеотидным последовательностям генов *sfp* бактерий *B. velezensis* G341 (CP011686.1), *Bacillus* sp. Bs-916 (CP009611.1) и *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* UCMB5033 (HG328253.1) и определяет синтез белка размером 25.5 кДа, идентичного на 100% с таковым бактерий рода *Bacillus* (WP_007410244.1).

Кроме вышеуказанных генетических детерминант, характерных практически для всех представителей *B. velezensis* и *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*, в хромосоме исследуемого штамма выявлен локус размером 17518 п.н. (рис. 2, табл. 3), состоящий из шести генов, два из которых детер-

минируют синтез поликетидсинтазы, а один определяет синтез нерибосомной пептидсинтазы. Поскольку химический состав метаболита (обозначен как *ngs*) не определен, считается, что он может иметь пептидную/поликетидную природу и синтезируется без участия рибосом. Сравнение данного локуса с известными, депонированными в ГенБанк NCBI, показал, что сходным образом организованная нуклеотидная последовательность встречается только в геноме трех штаммов (*B. velezensis* BS-37, *B. velezensis* FZB42 и *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* CC178). В состав данного локуса входят гены, в значительной степени отличающиеся по Г/Ц-составу от остальных хромосомных детерминант. Доля Г/Ц-пар в данном локусе варьирует от 27 до 32%, тогда как среднее число Г/Ц-пар в хромосоме исследуемого штамма и у других представителей *B. velezensis* и *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* соответствует значению 46.5%. Данный факт свидетельствует о чужеродном происхождении данного генетического кластера, попавшего в геном в результате горизонтального переноса [24]. Установлено, что гены, входящие в этот локус экспрессируются и обеспечивают образование в клетке сложного соединения, обладающего функцией сидерофора и отвечают за транспорт железа в клетку-хозяина, отсутствие которого в ризосфере препятствует развитию грибов и бактерий [19].

В отличие от всех вышеописанных метаболитов, только бактериоцин амилоциклицин, представляющий собой циклический пептид, синтезируется с участием рибосом и его образование в клетке зависит от экспрессии шести генов (локус размером 4172 п.н. (рис. 2)), присутствие которых также характерно для большинства представителей *B. velezensis* и *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* [25].

Таким образом, в геноме бактерий *B. velezensis* БИМ В-439Д было обнаружено 10 генетических локусов общей протяженностью 336520 п.н. (8.5% от всего генома), детерминирующих синтез антимикробных соединений. Выявленные детерминанты являются высоко консервативными и присутствуют в геномах многих представителей *B. velezensis* и *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*, что дает основание предположить их функциональную активность в клетках исследуемого штамма.

В ходе выполнения данной работы была изучена способность бактерий *B. velezensis* БИМ В-439Д синтезировать полифункциональные липопептиды. Ранее для штамма *B. velezensis* FZB42 было установлено, что его антифунгальная активность зависит от бациллибактина и фенгигина, тогда как сурфактин не влиял на их способность подавлять развитие патогенного гриба *Fusarium oxysporum*.

Подобные результаты были получены и для штамма *B. subtilis* 916 [11, 23]. В научных публикациях сурфактину отводится ключевая роль в образовании биопленок и адгезии, способствующей взаимодействию микроорганизмов с растением [23]. Полагают, что сурфактин, обеспечивая образование биопленки при поверхностной колонизации корней растений, защищает синтезирующих его бактерий от других микроорганизмов, в том числе, патогенных. Для установления роли сурфактина в антифунгальной активности исследуемого штамма методом направленного мутагенеза были отобраны варианты с нарушенным синтезом этого метаболита (нарушен *urf*-оперон в результате инсерции в ген *urfAA*). Посредством масс-спектрометрического анализа было установлено, что в КЖ штамма дикого типа после его культивирования в течение 24 ч выявляются две формы сурфактина (с разной длиной углеродной цепи – C14 и C15), небольшое количество фенгигина (C16) и следовые количества бацилломицина (C14). После 48 ч культивирования в КЖ бактерий возросло количество фенгигина C16, появлялся фенгигин C17, бацилломицин не обнаруживался. В тоже время в КЖ мутантного штамма *urf*[−] вне зависимости от времени культивирования отсутствовал сурфактин, но после 48 ч выращивания достоверно выявлялись фенгигин C16 и C17 и бацилломицин C14 (табл. 4, рис. 3). Полученные данные свидетельствуют об отсутствии синтеза сурфактина у мутантных бактерий и его повышенной способности синтезировать фенгигин и бацилломицин. Анализ антагонистической активности позволил установить, что у мутантных бактерий увеличилась антибактериальная активность в отношении фитопатогенных бактерий *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Agrobacterium tumefaciens*, сохранилась антифунгальная активность по отношению к грибам *Penicillium expansum*, *Alternaria*

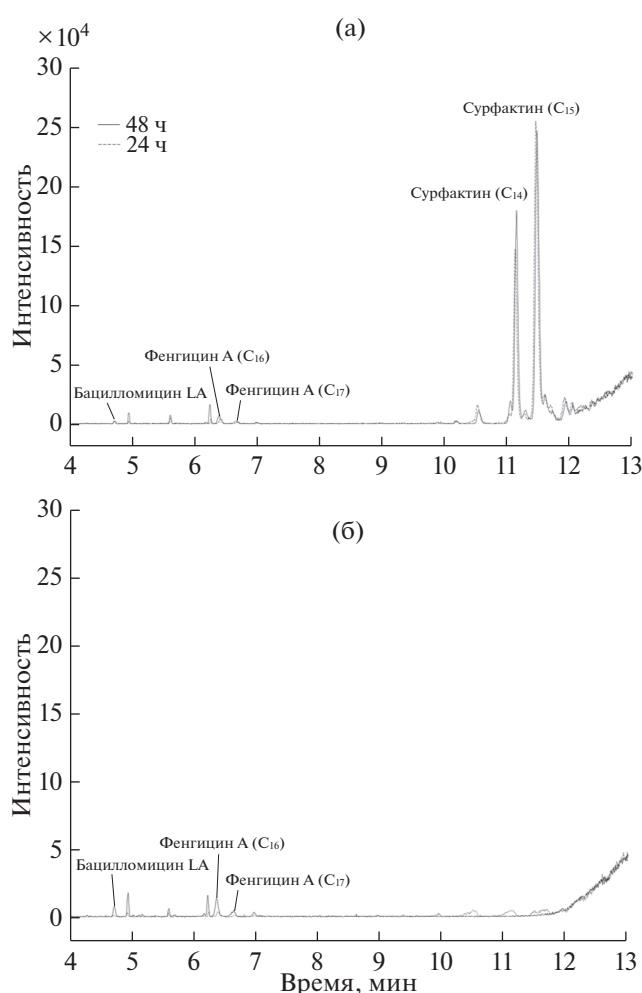


Рис. 3. Хроматограммы липопептидов, продуцируемых диким (а) и мутантным штаммами (б) бактерий *B. velezensis* БИМ В-439Д за 24 и 48 ч культивирования.

tenuis, *Botrytis cinerea*, *Bipolaris sorokiniana* и заметно снизилась способность подавлять рост грибов рода *Fusarium* (табл. 5, рис. 4). Таким образом, при отсутствии сурфактина в КЖ штамма *B. velezensis* БИМ

Таблица 4. Продукция липопептидов исходным и мутантным вариантами бактерий *B. velezensis* БИМ В-439Д

Липопептид	Масса/заряд	Изоформа	Время удержания, мин	Интенсивность*			
				исходный штамм		мутант <i>urf</i> [−]	
				24 ч	48 ч	24 ч	48 ч
Сурфактин	1021.66749	C14[M+H] ⁺	11.146	12.597	13.680	—	—
	1035.68314	C15[M+H] ⁺	11.478	22.862	21.822	—	—
Фенгигин	1462.79593	C16[M+H] ⁺	6.389	0.850	1.210	0.676	2.137
	1476.81158	C17[M+H] ⁺	6.622	—	0.403	—	0.577
Бацилломицин	1020.51278	C14[M+H] ⁺	4.725	0.324	—	—	1.232

* Интенсивность (усл. ед.) образования липопептидов соответствует величине пика, характерного для отдельных изоформ (положение пика определяли на основании соотношения масса/заряд).

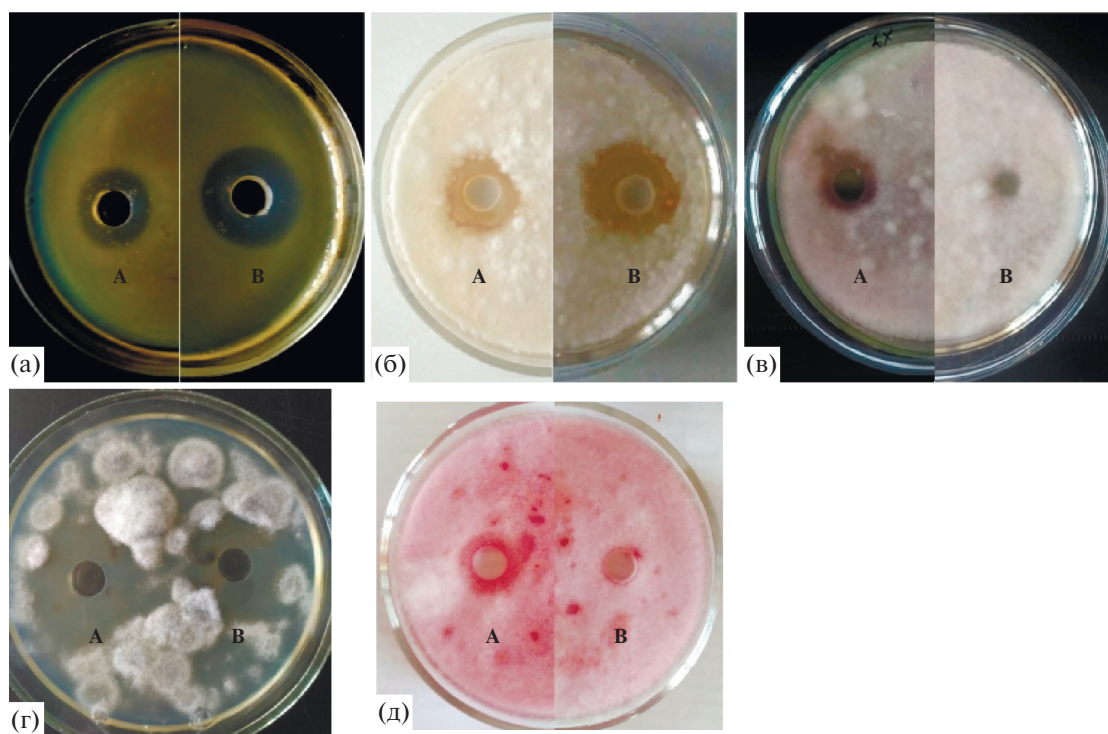


Рис. 4. Тест на антимикробную активность КЖ штаммов дикого типа слева на чашке Петри и мутантных *B. velezensis* БИМ В-439Д (справа). Зоны задержки роста патогенных бактерий *X. campestris* pv. *campestris* (а) и патогенных грибов: *P. expansum* (б), *F. culmorum* (в); *Ph. betae* (г); *F. avenaceum* (д).

В-439Д наблюдались специфические изменения антимикробной активности бактерий, что свидетельствует о влиянии этого метаболита на проявление антагонизма. Полученные результаты могут указывать на различия в регуляции синтеза липопептидов

у исследуемых бактерий по сравнению с близкородственными штаммами *B. velezensis* FZB42 и *B. subtilis* 916.

Наличие полной нуклеотидной последовательности хромосомы бактерий *B. velezensis* БИМ

Таблица 5. Антимикробная активность бактерий *B. velezensis* БИМ В-439Д

Патогенный микроорганизм	Зоны задержки роста патогена под действием КЖ, мм	
	исходный штамм	инсерционный мутант <i>srf</i> ⁻
<i>Pseudomonas. syringae</i> var. <i>syringae</i>	38 ± 0.3	39 ± 0.5
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	24 ± 0.8	27 ± 0.7
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	23 ± 0.9	25 ± 0.6
<i>Fusarium graminearum</i>	30 ± 0.9	27 ± 1.0
<i>Fusarium oxysporum</i>	28 ± 1.0	19 ± 0.7
<i>Fusarium culmorum</i>	25 ± 0.7	17 ± 0.6
<i>Fusarium avenaceum</i>	23 ± 0.9	15 ± 0.9
<i>Botrytis cinerea</i>	27 ± 0.9	24 ± 0.7
<i>Alternaria tenuis</i>	24 ± 0.3	23 ± 1.0
<i>Penicillium expansum</i>	23 ± 0.4	25 ± 0.8
<i>Bipolaris sorokiniana</i>	33 ± 0.6	31 ± 0.6
<i>Phoma betae</i>	31 ± 0.5	27 ± 0.4

В-439Д и выявленные особенности в организации и локализации мобильных генетических элементов и отдельных генетических детерминант могут служить надежным генетическим паспортом штамма при его коммерческом использовании.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Borriss R.* // *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Growth Responses* / Ed. D.K. Maheshwari. Heidelberg: Springer, 2011. P. 41–76.
2. *Chen X.H., Koumoutsis A., Scholz R., Borriss R.* // *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2009. V. 16. № 1–2. P. 14–24. doi 10.1159/000142891
3. *Bullock W.O., Fernandez J.M., Short J.M.* // *Biotechniques*. 1987. V. 5. № 3. P. 376–379.
4. *Palmer B.R., Marinus M.G.* // *Gene*. 1994. V. 143. № 1. P. 1–12. https://doi.org/10.1016/0378-1119(94)90597-5
5. *Vieira J., Messing J.* // *Gene*. 1982. V. 19. № 3. P. 259–268.
6. *Steve P. Chambers, Sue E. Prior, David A. Barstow, Nigel P. Minton* // *Gene*. 1988. V. 68. № 1. P. 139–149.
7. *Миллер Дж.* Эксперименты в молекулярной генетике / Ред. С.И. Алиханяна. М.: Мир, 1976. 436 с.
8. *Дудка И.А., Вассер С.П., Элланская И.А., Коваль Э.З., Горбик Л.Т., Никольская Е.А. и др.* // *Методы экспериментальной микологии: справочник* / Ред. В.И. Билай. Киев: Наукова думка, 1982. 429 с.
9. *Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж.* Методы генетической инженерии: молекулярное клонирование / Ред. А.А. Баев, К.Г. Скрыбина. М.: Мир, 1984. 479 с.
10. *Koumoutsis A., Chen X.H., Henne A., Liesegang H., Hitzeroth G., Franke P., Vater J., Borriss R.* // *J. Bacteriol.* 2004. V. 186. № 4. P. 1084–1096.
11. *Richter M., Rosselló-Móra R., Oliver Glöckner F., Peplies J.* // *Bioinformatics*. 2016. V. 32. № 6. P. 929–931.
12. *Yokota K., Yatsuda M., Miwa E., Higuchi K.J.* // *J. ISSAAS*. 2012. V. 18 № 1. P. 70–75.
13. *Yang H., Li X., Li X., Yu H., Shen Z.* // *Anal. Bioanal. Chem.* 2015. V. 407. № 9. P. 2529–2542. https://doi.org/10.1007/s00216-015-8486-8
14. *Сэгу Й.* Методы почвенной микробиологии. М.: Колос, 1983. 253 с.
15. *Darling A.E., Mau B., Perna N.T.* // *PLoS ONE*. 2010. V. 5. № 6. art. no. e11147. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011147
16. *Fan B., Blom J., Klenk Hans-P., Borriss R.* // *Frontiers in Microbiol.* 2017. V. 8. № 22. P. 1–15.
17. *Niazi A., Manzoor Sh., Asari S., Bejai S., Meijer J., Bongcam-Rudloff E.* // *PLOS ONE*. 2014. V. 9. № 8. art. no. e104651. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104651
18. *Rückert Ch., Blom J., Chen X.H., Revac O., Borriss R.J.* // *Biotechnol.* 2011. № 155. P. 78–85.
19. *Chen X.H., Koumoutsis A., Scholz R., Eisenreich A., Schneider K., Heinemeyer I. et al.* // *Nature Biotechnology*. 2007. V. 25. P. 1007–1014. Published online 19 August 2007; doi 10.1038/nbt1325
20. *Borriss R., Chen X.H., Rückert Ch., Blom J., Becker A., Baumgarth B., Fan B., Pukall R., Schumann P., Spröer C., Junge H., Vater J., Pühler A., Klenk Hans-P.* // *International J. Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2011. P. 1786–1801.
21. *Christopher A. Dunlap, Soo-Jin Kim, Soon-Wo Kwon, Alejandro P. Rooney* // *International J. Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2016. V. 66. P. 1212–1217.
22. *Klappenbach J.A., Dunbar J.M., Schmidt T.M.* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2000. V. 66. P. 1328–1333.
23. *Luo C., Liu X., Zhou H., Wang Z., Chen X.H.* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2015. V. 81. № 1. P. 422–431.
24. *Reva O.N., Tümmeler B.* // *BMC Bioinformatics*. 2005. V. 6. № 251. P. 1–12.
25. *Scholz R., Vater J., Budiharjo A., Wang Z., He Y., Dietel K., Schwecke T., Herfort S., Lasch P., Borriss R.* // *J. Bacteriol.* 2014. V. 196. № 10. P. 1842–1852.

Molecular-Genetic and Functional Analysis of the Genome of Bacteria *Bacillus velezensis* BIM-439D

A. V. Berezhnaya^{a,*}, O. V. Evdokimova^a, L. N. Valentovich^a, N. V. Sverchkova^a,
M. A. Titok^a, and E. I. Kolomiyets^a

^a*Institute of Microbiology, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, 220141 Belarus*

*e-mail: anastasiya1981@bk.ru

Received October 9, 2018; revised January 10, 2019; accepted February 20, 2019

As a result of the pangenomic sequencing of the bacteria *Bacillus velezensis* BIM B-439D, it was found that their genome is represented by one circular chromosome of 3978954 bp in size and contained 3969 predicted genes. Chromosome has 10 conserved loci that determine the production of antimicrobial compounds of different chemical nature: lipopeptides (surfactin, bacillomycin, fengycin), polyketides (bacillaene, difficidin/oxydifficidin, macrolactin), siderophore bacillibactin, dipeptide bacilysin, polypeptide/polyketide uncertain composition and bacteriocin amylocyclin. By the method of directed mutagenesis, mutants with impaired synthesis of surfactin have been obtained, which are characterized by an increased formation of the bacillomycin and fengycin. At the same time, the mutants showed high antimicrobial activity against a number of bacterial and fungal pathogens (*Penicillium expansum*, *Alternaria tenuis*, *Botrytis cinerea*, *Bipolaris sorokiniana*), but to a lesser extent inhibited the growth of fungi of the genus *Fusarium*.

Keywords: *Bacillus velezensis*, genome, antimicrobial compounds, antagonism, surfactin