

ISSN 1561-8323 (Print)

ISSN 2524-2431 (Online)

УДК 579.832/833:577.212.3

<https://doi.org/10.29235/1561-8323-2018-62-5-592-600>

Поступило в редакцию 12.07.2018

Received 12.07.2018

**М. А. Титок, Л. Н. Валентович, А. В. Бережная,  
член-корреспондент Э. И. Коломиец**

*Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь*

### **АНАЛИЗ ГЕНОМА БАКТЕРИЙ *BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS* БИМ В-439Д**

**Аннотация.** Согласно результатам анализа полной нуклеотидной последовательности бактерий *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* БИМ В-439Д, установлено, что геном штамма является уникальным и представлен одной кольцевой хромосомой размером 3978134 пар нуклеотидов, содержащей 46,50 % Г/Ц-пар. Определены ключевые генетические локусы, детерминирующие синтез антимикробных метаболитов: липопептидов (сурфактин, фенгизин, бацилломицин D), дипептида (бацилизин), сидерофора (бациллибактин), поликетидных антибиотиков (диффицидин/оксидиффицидин, бациллин и макролактин), циклического бактериоцина (амилоциклицин), а также пептида/поликетид (предположительно – тироцидин), охарактеризованы системы рестрикции-модификации и мобильные генетические элементы (IS-элементы и профаги). Выявленные особенности в организации и локализации отдельных генетических детерминант (например, интактный профаг размером 37558 п. н.) могут использоваться в качестве надежных молекулярно-генетических маркеров для быстрой идентификации штамма при его коммерческом использовании. Полная нуклеотидная последовательность генома может служить основой для детального функционального анализа практически значимых свойств микроорганизмов группы *Bacillus*.

**Ключевые слова:** *Bacillus*, геном, профаг, метаболиты, антимикробная активность

**Для цитирования.** Анализ генома бактерий *Bacillus amyloliquefaciens* БИМ В-439Д / М. А. Титок [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2018. – Т. 62, № 5. – С. 592–600. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2018-62-5-592-600>

**Marina A. Titok, Leonid N. Valentovich, Anastasiya V. Berezhnaya,  
Corresponding Member Emiliya I. Kolomiets**

*Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus*

### **ANALYSIS OF THE GENOME OF THE BACTERIA *BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS* BIM B-439D**

**Abstract.** According to the results of the analysis of the complete nucleotide sequence of *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* BIM B-439D, it is established that the genome of the strain is unique and is represented by a single ring chromosome with a size of 3978134 base pair containing 46.5 % G/C-pairs. The key genetic loci determining synthesis of antimicrobial metabolites are defined: lipopeptides (surfactin, fengycin, bacillomycin D), dipeptide (bacilysin), siderophore (bacillibactin), polyketide antibiotics (difficidin and oxydifficidin, bacillaene and macrolactin), bacteriocin (amylocyclicin) and peptide/polyketide (putative – tyrocidin), restriction-modification systems and mobile genetic elements (IS-elements and prophages) are characterized. The identified features in the organization and localization of individual genetic determinants (for example, intact prophage of 37558 bp) can be used as reliable molecular genetic markers for fast identification of the strain when it is used commercially. The complete nucleotide sequence of the genome can serve as the basis for a detailed functional analysis of the practically significant properties of the microorganisms of the *Bacillus* group.

**Keywords:** *Bacillus*, genome, prophage, metabolites, antimicrobial activity

**For citation:** Titok M. A., Valentovich L. N., Berezhnaya A. V., Kolomiets E. I. Analysis of the genome of the bacteria *Bacillus amyloliquefaciens* BIM B-439D. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2018, vol. 62, no. 5, pp. 592–600 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2018-62-5-592-600>

**Введение.** Производители сельскохозяйственной продукции во всем мире проявляют большую заинтересованность в биологических средствах защиты растений, позволяющих сократить использование химических препаратов и получить качественные продукты питания. В качестве

основы биопрепаратов применяются природные микроорганизмы (бактерии, грибы и вирусы), продуцирующие широкий спектр биологически активных соединений, обеспечивающих подавление патогенов и стимулирующих рост и развитие растений. В этом плане особый интерес представляют повсеместно распространенные бактерии *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* и близкородственные *B. velezensis*, характеризующиеся способностью вступать в плотный контакт с растением (в частности, с корневой системой), продуцировать широкий спектр вторичных метаболитов антимикробного действия, активировать системы иммунного ответа растений и синтезировать гормоны, стимулирующие их рост [1]. В последнее время большую популярность приобретают биофунгициды, основу которых составляют бактерии этой систематической группы (например, биопрепараты Serifel, Integral Pro, Velondis Extra используются в Южной и Центральной Америке, Азии, Франции и Германии). В тепличных хозяйствах Республики Беларусь для защиты огурцов и томатов от болезней разной этиологии применяется зарегистрированный биоpestицид Бетапротектин, в состав которого входят бактерии *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* БИМ В-439Д. Данные микроорганизмы, выделенные из образца дерново-подзолистой почвы на территории Минской области, проявляют выраженную антимикробную активность по отношению к фитопатогенным грибам *Fusarium oxysporum*, *Botrytis scinerea*, *Penicillium expansion*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Alternaria tenuis*, *Phoma betae* и бактериям *Xantomonas campestris* pv. *campestris*, *Pectobacterium carotovorum*, *Pseudomonas syringae*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* и *Agrobacterium tumefaciens*, вызывающим различного рода заболевания сельскохозяйственных и декоративных растений (в частности, рак, гнили, пятнистости и др.).

В настоящее время для детального изучения важных практически микроорганизмов широко используется полногеномное секвенирование. Данная технология позволяет 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 функциональную активность.

Цель работы – первичный анализ полной нуклеотидной последовательности генома *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* БИМ В-439Д.

**Материалы и методы исследования.** Бактерии *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* БИМ В-439Д выращивали в полноценной жидкой среде ГВ [2]. Тотальную ДНК выделяли с помощью набора реагентов «Bacteria DNA Preparation Kit» (Jena Bioscience GmbH). Для подготовки библиотек ДНК для секвенирования применяли набор Nextera XT (Illumina). Высокопроизводительное определение нуклеотидных последовательностей проводили на приборе MiSeq (Illumina), используя комплект реактивов MiSeq Reagent Kit v3 2 × 300 циклов (Illumina). Для оценки качества полученных данных применяли программу FastQC [3]. Прочтения с низким качеством отфильтровывали с помощью программы Trimmomatic-0.36 [4]. Сборку прочтений осуществляли с помощью программы SPAdes-3.11.1 [5]. Картирование прочтений на собранные последовательности ДНК производили с помощью программы Bowtie 2.2.7 [6], что позволило оценить правильность работы программы ассемблера. Объединение контигов в кольцевую хромосому осуществляли, используя опубликованные данные о геномах близкородственных бацилл из базы данных ГенБанк. Предварительную аннотацию генома проводили с помощью системы RAST 2.0 [7] и PROKKA 1.12 [8]. Сравнение полученных нуклеотидных последовательностей с доступными последовательностями из базы данных ГенБанк проводили с помощью программ BLASTN 2.3.1 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) и Mauve 2.4.0 [9]. Поиск профаговых последовательностей осуществлялся с помощью веб-сервиса PHASTER [10]. Рисунки генетических локусов составляли с помощью веб-сервиса Gene Graphics [11].

**Результаты и их обсуждение.** Анализ общей структуры генома бактерий *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* БИМ В-439Д в сравнении с изученными в этом отношении микроорганизмами позволил установить характерные особенности, свойственные микроорганизмам данной

систематической группы, а также выявить уникальные свойства исследуемого штамма. На настоящий момент в ГенБанк 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. Следует отметить, что ряд типичных представителей вида *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* в разных литературных источниках фигурирует как *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* или *B. velezensis* (например, в ГенБанке наиболее изученный штамм FZB42 обозначен как *B. velezensis*, в то же время в научных публикациях он фигурирует как *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*). Такая неоднозначность в классификации в целом характерна для микроорганизмов в силу их внутривидового разнообразия. В связи с вышесказанным, для лучшего восприятия приведенных ниже результатов необходимо учитывать, что эти два вида являются практически идентичными и только дело времени, чтобы они получили одно унифицированное название.

Геном исследованных бактерий представлен одной кольцевой хромосомой размером 3978134 п. н., содержащей 46,50 % Г/Ц-пар. В состав хромосомы входит 3912 открытых рамок считывания, способных определять синтез 3798 полипептидов, а также молекул рРНК и тРНК. При этом гены, кодирующие субъединицы рибосом, как правило, расположены несколькими кластерами (5S, 16S, 23S). В хромосоме бактерий *B. velezensis* (например, штамм G341, CP011686) и *B. amyloliquefaciens* (например, штамм UCMB5033, HG328253) встречается до 10 кластеров генов, кодирующих рРНК. В хромосоме исследуемых бактерий присутствует 9 генетических локусов, определяющих синтез 27 молекул рРНК. Практически для всех бактерий этой таксономической группы характерно большое число генов, кодирующих синтез тРНК. Их количество варьирует от 51 у штамма *B. velezensis* SB 1216 (CP015417) до 95 у штамма *B. velezensis* G341 (CP011686). Анализируемый штамм содержит 86 генов, детерминирующих синтез тРНК. Следует отметить, что такое большое содержание в клетке компонентов аппарата трансляции свидетельствует о высокой эффективности синтеза белка, и следовательно, активных процессах метаболизма. В подтверждение можно привести данные RAST-анализа генома *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* БИМ В-439Д в сравнении с известными представителями этой группы бактерий. Как видно из данных, приведенных в табл. 1, наибольшее число генетических детерминант в клетке определяет метаболизм углеводов (от 413 до 423 генов), аминокислот (от 437 до 438 генов), белков (от 166 до 196 генов), жирных кислот, липидов, изопреноидов (от 138 до 141 гена), а также синтез кофакторов, витаминов, простетических групп и пигментов (от 230 до 241 гена). Это вполне закономерно, поскольку данные микроорганизмы продуцируют широкий спектр антибиотикоподобных соединений нерибосомной природы, для синтеза которых требуется активный углеводный обмен, в ходе которого образуются 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 многих представителей *B. amyloliquefaciens* и *B. velezensis*.

Анализ хромосомной ДНК бактерий *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* БИМ В-439Д позволил выявить два варианта инсерционных элементов семейства IS3 (6 копий варианта IS150A и 6 копий IS150B размером 1285 и 1284 п. н. соответственно), отличающихся между собой заменами, вставками и делениями отдельных нуклеотидов, затрагивающими порядка 130 позиций. При этом все обнаруженные IS-последовательности локализируются между генами, не нарушая

Т а б л и ц а 1. Вклад отдельных генетических детерминант в общий метаболизм клетки бактерий, обладающих антимикробной активностью и стимулирующих рост растений

T a b l e 1. Contribution of individual genetic determinants to the general metabolism of bacteria cells with antimicrobial activity and stimulating plant growth

| Генетические детерминанты, определяющие в клетке<br>Genetic determinants that determine in the cell | Штамм<br>Strain |       |        |       |         |       |
|---|-----------------|-------|--------|-------|---------|-------|
|   | 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   | 2680            | 100   | 2736   | 100   | 2730    | 100   |

П р и м е ч а н и е. Для штамма *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* БИМ В-439Д приведены данные RAST-анализа. Для штаммов *B. amyloliquefaciens* FZB42 и *B. velezensis* GH1-13 аналогичные данные заимствованы из литературных источников [12].

N o t e. The data of the RAST-analysis are given for the strain *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* BIM В-439D. For strains *B. amyloliquefaciens* FZB42 and *B. velezensis* GH1-13, similar data are taken from literature data [12].

Т а б л и ц а 2. Характеристика профагов бактерий *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* БИМ В-439ДT a b l e 2. Characteristic of prophages bacteria *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* BIM В-439D

| Координаты профага (размер, п. н.)<br>Prophage coordinates (size, b. p.) | Наиболее схожий фаг<br>Most similar phage |  |  | В хромосоме исследуемых бактерий<br>In the chromosome of the studied bacteria |   |
|--|---|--|--|---|---|
|  | Название<br>Phage name                    | Бактерия-хозяин<br>Host bacterium          | № в ГенБанке NCBI<br>No. in GenBank NCBI | Геном фага<br>Phage genome  | Количество фаговых генов, кодирующих белки<br>Number of phage genes encoding proteins |
| 1183850–1215481<br>(31631 п. н.)   | phiCT453A                                 | <i>Clostridium tetani</i><br>ATCC 453      | NC_028991                                | неполный  | 45  |
| 1995258–2032815<br>(37558 п. н.)   | SANTOR1                                   | <i>Enterococcus faecalis</i><br>ATCC 19433 | NC_031051                                | полный*   | 27  |
| 2647315–2684906<br>(37 592 п.н.)   | phi105                                    | <i>Bacillus subtilis</i>                   | NC_004167                                | полный  | 41  |

П р и м е ч а н и е. Данные получены с использованием программы PHASTER; \* – в геноме фага присутствуют типичные att-сайты (attL и attR).

N o t e. Data obtained using PHASTER; \* – in the genome of the phage are present a typical att-sites (attL and attR).

открытых рамок считывания. Следует отметить, что подобного типа мобильные элементы встречаются в геномах бактерий *B. amyloliquefaciens* и *B. velezensis* [13]. 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. amyloliquefaciens* FZB42 (выделен из зараженной патогенами почвы в Германии) обнаруживается 3 копии только IS150A. В то же время штамм *B. amyloliquefaciens* Y2, изолированный из ризосферы пшеницы в Китае, вообще их не содержит (результаты BLASTN-анализа). Помимо IS-элементов в геноме бактерий *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* БИМ В-439Д обнаружено два полноразмерных и один дефектный профаг (табл. 2). Один из полноразмерных вирусов (37558 п. н.), предположительно относящийся к группе *Caudovirus*, имеет уникальную локализацию (координаты 1995258–2032815), не сходную с ортологичными последовательностями, обнаруживаемыми в хромосомах некоторых других представителей подвида *B. amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* (например, штамм DSM7). Последовательность встроенного фага содержит 37 % Г/Ц-пар, что практически на 10 % меньше, чем в хромосоме клетки хозяина. Другой нуклеотидный состав встроенного профага свидетельствует в пользу того, что общий предок данных бактерий не содержал этого вируса и его интеграция в хромосому произошла относительно недавно. Второй интактный вирус размером 37592 п. н. (координаты 2647315–2684906) по Г/Ц-составу практически не отличается от такового клетки хозяина и отдельные участки его генома встречаются в хромосомах бактерий рода *Bacillus*. Нуклеотидная последовательность еще одного – дефектного – профага размером 31632 п. н. (координаты 1183850–1215481) обнаруживается также в хромосомах бактерий *B. amyloliquefaciens* (штамм КНГ19), *B. velezensis* (штаммы СМТ-6 и NJN-6) и *B. subtilis* В-1 (по нуклеотидной последовательности идентичны на 99 %). Следует отметить, что в хромосомах практически всех бактерий содержатся интактные или дефектные вирусные геномы, присутствие которых может защищать клетку от проникновения других подобных вирусов, свободно циркулирующих во внешней среде.

Отсутствие в геноме исследуемого штамма большого числа мобильных элементов свидетельствует о наличии эффективных систем защиты, препятствующих проникновению чужеродных нуклеиновых кислот. Следует отметить, что для бактерий характерно, по крайней мере, четыре системы такой защиты. Это системы токсин–антитоксин, abortивной инфекции, CRISPR/Cas9 и рестрикции–модификации. Благодаря системе токсин–антитоксин, бактериальная клетка может беспрепятственно синтезировать соединения, направленные как против других бактерий, так и чужеродных молекул нуклеиновых кислот. При этом присутствие антитоксина защищает ее от гибели. Abortивная инфекция и CRISPR/Cas9 препятствуют размножению вирусов, попавших в бактериальную клетку. Белки рестрикции–модификации призваны защищать бактерию от чужеродных молекул ДНК [14].

В геноме бактерий *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* 439Д локализовано, по крайней мере, четыре гена, кодирующих консервативные белки антитоксины, защищающие клетку от продуцируемых ею токсинов, направленных против бактерий и молекул нуклеиновых кислот чужеродного происхождения. Система рестрикции–модификации у данных бактерий представлена четырьмя генами, кодирующими белки, обеспечивающие метилирование собственной хромосомной ДНК и рестрикцию чужеродной ДНК. При этом один из генов (*orf626*) детерминирует синтез рестриктазы II типа *Bg/II*. Сходная по нуклеотидному составу детерминанта присутствует в геноме только у двух бактерий *B. velezensis* СМТ-6 (CP025341) и *B. subtilis* CW14 (CP016767), тогда как гомологичный белок синтезируется в клетках большого числа бактерий *B. amyloliquefaciens* (WP\_032867626.1). Данный факт может свидетельствовать об определенной стратегии, выработанной микроорганизмами данной систематической группы, суть которой заключается в определенной комбинации генов, детерминирующих белки рестрикции и модификации, позволяющие им защищать клетки не только от вирусной ДНК, но и от проникновения ДНК близкородственных бактерий. Такая стратегия весьма оправдана, поскольку бактерии рода *Bacillus* обладают системой естественной компетентности, определяющей способность поглощать ДНК из

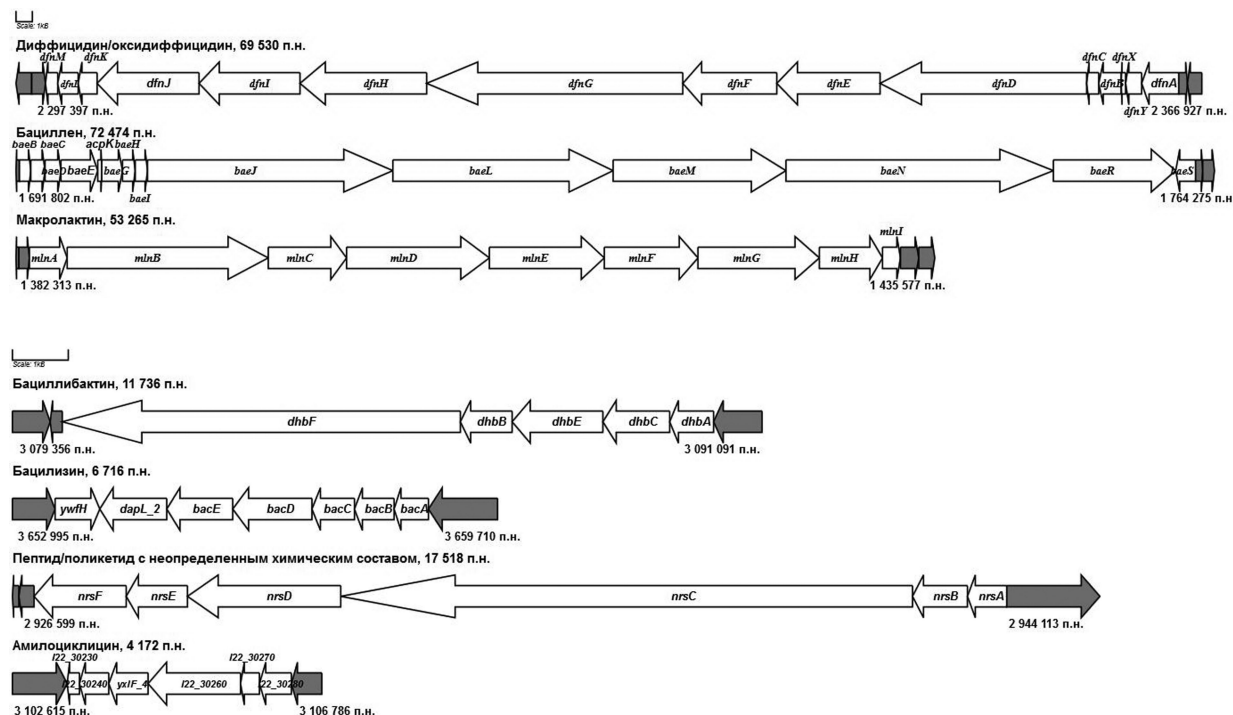


Рис. 1. Генетическая карта локусов, определяющих синтез поликетидных соединений (диффицидина, бациллеина, макролактин), сидерофора бациллибактина, дипептида бацилизина, пептида/поликетид с неопределенным химическим составом и бактериоцина (амилоциклин) у бактерий *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* БИМ В-439Д. Неокрашенными стрелками указаны функциональные гены, входящие в состав локусов и детерминирующие синтез метаболитов и направления их транскрипции, серыми – гены, окаймляющие локусы. Цифры рядом с названием вторичного метаболита обозначают размер локуса, определяющего его синтез. Цифры под крайними генами обозначают координаты локусов в геноме

Fig. 1. Genetic map of the loci that determine synthesis of polyketide compounds (difficidin, bacillaene and macrolactin), siderophor bacillibactin, dipeptide bacilysin, peptide/polyketide with uncertain chemical composition and bacteriocin (amylocyclin) of bacteria *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* BIM B-439D. Non-colored arrows indicate functional genes that are part of the loci and determine the synthesis of metabolites and the direction of their transcription, gray – genes that border the loci. The numbers next to the name of the secondary metabolite indicate the size of the locus that determines its synthesis. The numbers under the extreme genes indicate the coordinates of the loci in the genome.

внешней среды. В хромосоме бактерий не выявлено системы CRISPR/Cas, однако присутствует локус (координаты 3875249–3881618), содержащий три гена, кодирующих синтез фаговой РНК хеликазы (*orf3804*), протеазы (*orf3805*) и обратной транскриптазы (*orf3806*), которые могут являться частью системы abortивной инфекции [15].

Однако ключевой системой бактерий рода *Bacillus*, защищающих их от чужеродной микрофлоры (грибов, вирусов и других бактерий), является присутствие в геноме целого набора локусов общей протяженностью 308849 п. н. (занимают около 8 % генома), определяющих продукцию широкого спектра антимикробных соединений. Именно эти генетические детерминанты представляют основной научный интерес и благодаря им данные микроорганизмы нашли широкое применение в качестве средств защиты растений от патогенов.

Штамм *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* БИМ В-439Д не является исключением, поскольку характеризуется широким спектром антимикробной активности и является основой биопрепарата Бетапротектин для защиты овощных культур и декоративных растений от болезней разной этиологии. Детальный анализ отдельных генетических детерминант позволяет с высокой достоверностью утверждать, что аналогично другим представителям *B. amyloliquefaciens* и *B. velezensis*, данный штамм обладает способностью продуцировать антимикробные метаболиты разного химического состава, синтез которых осуществляется без участия рибосом. В геноме

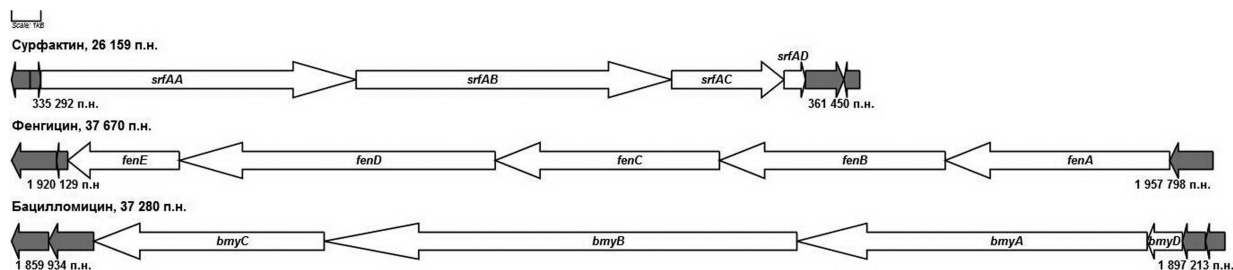


Рис. 2. Генетическая карта локусов, определяющих синтез липопептидных соединений у бактерий *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* БИМ В-439Д. Обозначения см. на рис. 1

Fig. 2. Genetic map of the loci that determine synthesis of lipopeptides of bacteria *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* BIM B-439D. See fig. 1 for description

данных бактерий обнаружены генетические локусы, определяющие синтез активных липопептидов (сурфактин, фенгицин, бацилломицин D), дипептида (бацилизин), сидерофора (бациллибактин), бактериоцина рибосомного синтеза (амилоциклин), поликетидных антибиотиков (диффицидин/оксидиффицидин, бациллен и макролактин), а также неопределенного пептида/поликетид с неизвестной химической структурой и функцией (предположительно – тироцидина) (рис. 1, 2). Сравнительный сиквенс-анализ промоторов, регуляторных и структурных генов, а также кодируемых ими полипептидов, определяющих синтез вышеуказанных соединений, выявил их идентичность на 99–100 % гомологичным последовательностям других представителей *B. amyloliquefaciens* и *B. velezensis*. Кроме того, синтез сурфактина и фенгицина данными микроорганизмами установлен экспериментально методом масс-спектрометрии (данные не приводятся).

Таким образом, в результате проведенного исследования установлена общая организация генома бактерий *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* БИМ В-439Д, определены ключевые генетические локусы, детерминирующие синтез антимикробных метаболитов, охарактеризованы системы рестрикции-модификации и мобильные генетические элементы (IS-элементы и профаги). Выявленные особенности организации и локализации отдельных генетических детерминант (например, ген, кодирующий рестриктазу II типа *BglII*, профаг размером 37558 п. н.) могут использоваться в качестве надежных молекулярно-генетических маркеров для быстрой идентификации штамма при его коммерческом использовании. Наличие полной нуклеотидной последовательности генома может служить основой для детального функционального анализа практически значимых свойств данных микроорганизмов.

### Список использованных источников

1. Borriss, R. Use of plant-associated *Bacillus* strains as biofertilizers and biocontrol agents in Agriculture / R. Borriss // *Bacteria in Agrobiolology: Plant Growth Responses* / ed. D. K. Maheshwari. – Heidelberg, German: Springer Heidelberg, 2011. – P. 41–76. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-20332-9\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-642-20332-9_3)
2. Миллер, Дж. Эксперименты в молекулярной генетике / Дж. Миллер; пер. с англ. Ю. Н. Зографа, Т. С. Ильиной, В. Г. Никифорова; под ред. С. И. Алиханяна. – М.: Мир, 1976. – 436 с.
3. Vabraham Bioinformatics – FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>. – Дата доступа: 02.05.2018.
4. Bolger, A. M. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data / A. M. Bolger, M. Lohse, B. Usadel // *Bioinformatics*. – 2014. – Т. 30, N 15 – P. 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
5. Геномный ассемблер SPAdes: Лаборатория алгоритмической биологии [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://cab.spbu.ru/software/spades/>. – Дата доступа: 02.05.2018.
6. Langmead, B. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2 / B. Langmead, S. L. Salzberg // *Nat. Methods*. – 2012. – Vol. 9, N 4 – P. 357–359. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>
7. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology / R. K. Aziz [et al.] // *BMC Genomics*. – 2008. – Vol. 9, N 1. – P. 75. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-75>

8. Seemann, T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation / T. Seemann // *Bioinformatics*. – 2014. – Vol. 30, Iss. 14. – P. 2068–2069 [Electronic resource]. – Mode of access: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>. – Date of access: 02.05.2018.
9. Mauve: Multiple Alignment of Conserved Genomic Sequence With Rearrangements / A. C. Darling [et al.] // *Genome Res.* – 2004. – Vol. 14, N 7 – P. 1394–1403. <https://doi.org/10.1101/gr.2289704>
10. PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool / D. Arndt [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 2016. – Vol. 44, N W1. – P. W16–W21. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw387>
11. Harrison, K. J. Gene Graphics: a genomic neighborhood data visualization web application / K. J. Harrison, V. de Crécy-Lagard, R. Zallot // *Bioinformatics*. – 2018. – Vol. 34, N 8. – P. 1406–1408. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx793>
12. The complete genome sequence of *Bacillus velezensis* strain GH1-13 reveals agriculturally beneficial properties and a unique plasmid / Sang Yoon Kim [et al.] // *Journal of Biotechnology*. – 2017. – Vol. 259. – P. 221–227. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.06.1206>
13. Factors determining the frequency of plasmid cointegrate formation mediated by insertion sequence IS3 from *Escherichia coli* / J. Spielmann-Ryser [et al.] // *Mol. Gen. Genet.* – 1991. – Vol. 226, N 3. – P. 441–448. <https://doi.org/10.1007/bf00260657>
14. Koonin, E. V. Evolutionary Genomics of Defense Systems in Archaea and Bacteria / E. V. Koonin, K. S. Makarova, Y. I. Wolf // *Annu. Rev. Microbiol.* – 2017. – Vol. 71, N 1. – P. 233–261. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090816-093830>
15. A reverse transcriptase-related protein mediates phage resistance and polymerizes untemplated DNA *in vitro* / C. Wang [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 2011. – Vol. 39, N 17. – P. 7620–7629. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr397>

## References

1. Borriss R. Use of plant-associated *Bacillus* strains as biofertilizers and biocontrol agents in Agriculture. Maheshwari D. K. (ed.). *Bacteria in Agrobiology: Plant Growth Responses*. Heidelberg, German, Springer Heidelberg, 2011, pp. 41–76. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-20332-9\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-642-20332-9_3)
2. Miller J. H. *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, 1972. 466 p.
3. *Babraham Bioinformatics – FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data*. Available at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> (accessed 2 May 2018).
4. Bolger A. M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 2014, vol. 30, no. 15, pp. 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
5. *Genome assembly SPAdes: Center for Algorithmic Biotechnology Web Server*. Available at: <http://cab.spbu.ru/software/spades/> (accessed 2 May 2018).
6. Langmead B., Salzberg S. L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods*, 2012, vol. 9, no. 4, pp. 357–359. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>
7. Aziz R. K., Bartels D., Best A. A., DeJongh M., Disz T., Edwards R. A., Formsma K., Gerdes S., Glass E. M., Kubal M., Meyer F., Olsen G. J., Olson R., Osterman A. L., Overbeek R. A., McNeil L. K., Paarmann D., Paczian T., Parrello B., Pusch G. D., Reich C., Stevens R., Vassieva O., Vonstein V., Wilke A., Zagnitko O. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics*, 2008, vol. 9, no. 1, pp. 75. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-75>
8. Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, 2014, vol. 30, is. 14, pp. 2068–2069. Available at: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153> (accessed 2 May 2018).
9. Darling A. C., Mau B., Blattner F. R., Perna N. T. Mauve: Multiple Alignment of Conserved Genomic Sequence With Rearrangements. *Genome Research*, 2004, vol. 14, no. 7, pp. 1394–1403. <https://doi.org/10.1101/gr.2289704>
10. Arndt D., Grant J., Marcu A., Sajed T., Pon A., Liang Y., Wishart D. S. PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. *Nucleic Acids Research*, 2016, vol. 44, no. W1, pp. W16–W21. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw387>
11. Harrison K. J., de Crécy-Lagard V., Zallot R. Gene Graphics: a genomic neighborhood data visualization web application. *Bioinformatics*, 2018, vol. 34, no. 8, pp. 1406–1408. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx793>
12. Sang Yoon Kim, Hajin Song, Mee Kyung Sang, Hang-Yeon Weon, Jaekyeong Song. The complete genome sequence of *Bacillus velezensis* strain GH1-13 reveals agriculturally beneficial properties and a unique plasmid. *Journal of Biotechnology*, 2017, vol. 259, pp. 221–227. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.06.1206>
13. Spielmann-Ryser J., Moser M., Kast P., Weber H. Factors determining the frequency of plasmid cointegrate formation mediated by insertion sequence IS3 from *Escherichia coli*. *MGG Molecular & General Genetics*, 1991, vol. 226, no. 3, pp. 441–448. <https://doi.org/10.1007/bf00260657>
14. Koonin E. V., Makarova K. S., Wolf Y. I. Evolutionary Genomics of Defense Systems in Archaea and Bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 2017, vol. 71, no. 1, pp. 233–261. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090816-093830>
15. Wang C., Villion M., Semper C., Coros C., Moineau S., Zimmerly S. A reverse transcriptase-related protein mediates phage resistance and polymerizes untemplated DNA *in vitro*. *Nucleic Acids Research*, 2011, vol. 39, no. 17, pp. 7620–7629. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr397>



**Информация об авторах**

*Титок Марина Алексеевна* – д-р биол. наук, профессор, гл. науч. сотрудник. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: m\_titok@yahoo.com.

*Валентович Леонид Николаевич* – канд. биол. наук, доцент, заведующий лабораторией. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: valentovich@mbio.bas-net.by.

*Бережная Анастасия Валерьевна* – науч. сотрудник. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: anastasiya1981@bk.ru.

*Коломиец Эмилия Ивановна* – член-корреспондент, д-р биол. наук, директор. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: kolomiets@mbio.bas-net.by.

**Information about the authors**

*Titok Marina Alekseevna* – D. Sc. (Biology), Professor, Chief researcher. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: m\_titok@yahoo.com.

*Valentovich Leonid Nikolaevich* – Ph. D. (Biology). Associate professor, Head of the Laboratory. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: valentovich@mbio.bas-net.by.

*Berezhnaya Anastasiya Valer'evna* – Researcher. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: anastasiya1981@bk.ru.

*Kolomiets Emiliya Ivanovna* – Corresponding Member, D. Sc. (Biology), Director. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: kolomiets@mbio.bas-net.by.