

гена *gusA*. У рослин моркви експресія *Mll::gusA* мала скоріше конститутивний профіль.

Mll promoter was cloned from sugar beet and linked to *gusA* gene to design binary vector. Transgenic tobacco and carrot plants and tobacco hairy roots harboured *Mll::gusA* and *35Sl::gusA* were obtained. GUS-analysis of transgenic tobacco plants and hairy roots transformed with *Mll::gusA* revealed root-specific gene expression. Reporter gene driven by *Mll* promoter has more likely constitutive expression in transgenic carrot.

КЛОЧКО В.В., ЗЕЛЕНА Л.Б., САФРОНОВА Л.А., АВДЄЄВА Л.В.

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Україна, Київ, 03680, вул. Заболотного, 154, e-mail: vvk@serv.imv.kiev.ua

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ ПРОБІОТИЧНИХ ШТАМІВ *BACILLUS SUBTILIS* УКМ В-5139 ТА УКМ В-5140

Пробіотичні препарати на основі бактерій роду *Bacillus* широко використовуються для корекції дисбіотичних станів. Застосування таких препаратів сприяє відновленню нормальної мікрофлори організму, покращує травлення, має імуностимулюючий та дезінтоксикуючий ефекти. Відібрані штами *B. subtilis* УКМ В-5139 та УКМ В-5140 впливають на неспецифічну резистентність теплокровних організмів: підвищують імунний статус і фагоцитарну активність лейкоцитів крові, стимулюють активність лімфоцитів і лімфоїдних структур, позитивно впливають на білковий склад крові і посилюють індукцію ендogenous інтерферону [1, 2]. Також дані штами характеризуються широкою антагоністичною активністю щодо ряду умовно-патогенних та патогенних мікроорганізмів [3].

До цього часу недостатньо вивченим є питання про межі окремих видів бацил. Широка мінливість цих бактерій і різноманітна біологічна активність обумовлюють високу внутрішньовидову гетерогенність деяких видів бацил. Застосування нових молекулярно-біологічних методів дослідження дало змогу встановити генетичну гетерогенність виду *Bacillus cereus*, однак такі дослідження не проводились для *Bacillus subtilis* — виду, який найчастіше виділяють з довкілля. Останнім часом з використанням сучасних генетичних методів досліджень було встановлено, що вид *B. subtilis* складається з групи споріднених видів і підвидів, які можна відокремити один від одного методами генетичного типування [4, 5].

Метою роботи було визначення штамової специфічності *B. subtilis* УКМ В-5139 та УКМ В-5140 з використанням методів молекулярно-біологічного аналізу.

Матеріали і методи

Об'єкти досліджень — штами *B. subtilis* УКМ В-5139 та УКМ В-5140, що зберігаються в Українській колекції мікроорганізмів та підтримуються у відділі антибіотиків Інституту мікробіології і вірусології НАН України.

Для дослідження процесів метаболізму та засвоєння джерел вуглецю використовували стандартизовані АРІ системи — АРІ 20Е та АРІ 50 СНВ/Е (Biomeгіеих, Франція), що містять вуглеводи, їх похідні, а також ряд інших сполук [6].

Виділення ДНК з суспензії клітин і ПЛР-аналіз проводили відповідно до методик, наведених у роботах [7, 8]. ПЛР виконували на ампліфікаторі “Терцик” (“ДНК-Технологія”, Росія).

Результати і їх обговорення

У результаті проведеного фізіолого-біохімічного аналізу встановлено, що штами *B. subtilis* УКМ В-5139 та УКМ В-5140 схожі між собою за засвоєнням більшості джерел вуглецю. Однак було виявлено і ряд відмінностей — штам УКМ В-5139, на відміну від УКМ В-5140, засвоював триптофан, не засвоював арбутин та D-туранозу. Після двох діб культивування штам УКМ В-5140 засвоював глікоген, D-цукрозу, D-целобіозу, метил- α D-глюкопіранозид та гліцерин, а споживання цих субстратів штамом УКМ В-5139 було відсутнє. Також у штама УКМ В-5139 газоутворення відбувалось при споживанні глікогена, а у штама В-5140 — інозита і D-маніта. Таку здатність до газоутворення з різними джерелами вуглецю можна використовувати для ідентифікації досліджуваних штамів.

З метою вивчення геномної мінливості даних штамів виду *B. subtilis* був проведений порівняльний аналіз спектрів продуктів ампліфікації з праймерами до міні- та мікросателітних послідовностей. Відмінності між штамми були виявлені при використанні 7 з 8 праймерів. Розмір ампліконів варіював від 200 до 1100 п.н. залежно від праймеру, а їх кількість — від 3 до 9 і становила, у середньому, 5 фрагментів на праймер.

У своїх дослідженнях ми використали універсальний праймер М13, який застосовують для видової ідентифікації мікроорганізмів. Згідно літературних даних [8, 9], представників різних видів можливо відрізнити, порівнюючи спектри фрагментів ампліфікації з праймером М13. У результаті ПЛР з праймером М13 і ДНК, виділеною з двох штамів виду *B. subtilis*, було відмічено, що кількість ампліконів в обох зразках однакова і складає 9 фрагментів розміром від 280 до 1100 п.н. Відмінностей у патернах ПЛР-продуктів між двома штамми не виявлено.

Ампліфікацію бактеріальної ДНК здійснювали з використанням 7 праймерів до мікросателітних послідовностей, з яких один містив тетра nukлеотидний повтор, а 6 — динуклеотидний повтор: 4 мали один “якірний” нуклеотид на 3'-кінці, а один праймер — два нуклеотиди. У результаті ПЛР з кожним праймером були виявлені фрагменти, що дозволяли відрізнити штами між собою, тобто ми спостерігали поліморфізм нуклеотидної послідовності (рис. 1).

Загальний спектр продуктів ампліфікації, залежно від праймеру, нараховував 3–9 фрагментів розміром від 200 до 1000 п.н. Найбільша кількість ампліконів — 9, зафіксована при використанні праймеру до тетра nukлеотидного повтору, а найменша — 3, з використанням праймеру (AG)₈G.

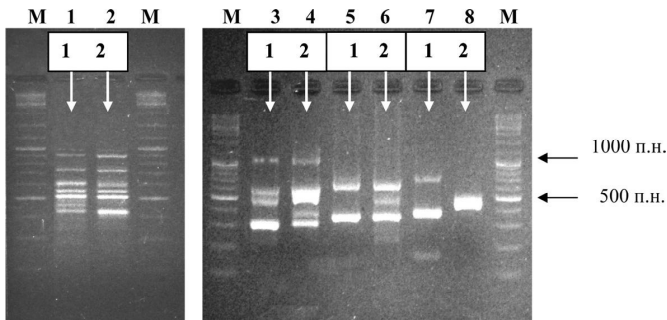


Рис. 1. Електрофореграма продуктів ампліфікації з праймерами до мікросателітних послідовностей і ДНК, виділеною з штамів *B. subtilis* УКМ В-5139 і УКМ В-5140. М — маркер молекулярної маси DNA ladder mix; праймери: 1, 2 — $(GACA)_4$; 3, 4 — $(AG)_8CT$; 5, 6 — $(AG)_8G$; 7, 8 — $(AG)_8T$

Кількість поліморфних фрагментів, в залежності від використаних праймерів, становила від одного до чотирьох ампліконів.

Отже, праймери, що давали значний відсоток поліморфних ампліконів, можна використовувати для аналізу гетерогенності геному представників виду *B. subtilis* та даних штамів зокрема. В той же час, праймери $(GACA)_4$, $(AG)_8G$ та $(AG)_8CT$, за спектрами яких ПЛР-продукти штамів *B. subtilis* УКМ В-5139 і УКМ В-5140 відрізнялися лише одним фрагментом, можна застосовувати для ідентифікації цих штамів.

Висновки

Таким чином, пробіотичні штами *B. subtilis* УКМ В-5139 і *B. subtilis* УКМ В-5140 мають ряд відмінностей як за фізіолого-біохімічними ознаками, так і за спектрами продуктів ампліфікації, що свідчить про необхідність вивчення додаткових філогенетичних ознак пробіотичних штамів бацил для уточнення їх таксономічного положення. Використані нами маркери до мікро- та мінісателітних послідовностей можна застосовувати для диференціації штамів *B. subtilis*.

Література

1. Кудрявцев В.А., Сафронова Л.А., Осадчая А.И., Ганова Л.А., Смирнов В.В. Влияние живых культур *Bacillus subtilis* на неспецифическую резистентность организма // Микробиол. Ж.— 1996.— Т.58, №2.— С. 46–55.
2. Подгорський В.С., Коцофляк О.И., Кирьянова Е.А., Гвоздяк О.Р. Украинская коллекция микроорганизмов. Каталог культур.— Киев: Наук. Думка.— 2007.— 426 с.
3. Кудрявцев В.А., Сафронова Л.А., Осадчая А.И., Вьюницкая В.А., Смирнов В.В. Антагонистическое действие на возбудителей эндометритов крупного рогатого скота // Микробиол. Ж.— 1993.— Т.55, №2.— С. 74–82.
4. Nakamura, L.K., Roberts, M.S. and Cohan, F.M. Relationship of *Bacillus subtilis* clades associated with strains 168 and W23: a proposal for *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* subsp. nov. and *Bacillus subtilis* subsp. *spizizeni* subsp. nov. // Int. J. Syst. Evolut. Microbiol.— 1999.— Vol.49.— P. 1211–1215.

5. Goto, K., Omura, T., Hara, Y. and Sadaie, Y. Application of the partial 16S rDNA sequence as an index for rapid identification of species in the genus *Bacillus* // *J. Gen. Appl. Microbiol.*— 2000.— Vol.46.— P. 1–8.

6. Logan N. A. and Berkeley R. C. W. Identification of *Bacillus* strains using the API System // *Journal of General Microbiology.*— 1984.— Vol.130.— P. 1871–1882.

7. Neve G., Meglecz E. Microsatellite frequencies in different taxa // *Trends Ecol. Evol.*— 2000.— Vol.15, N9.— P. 3761.

8. Rossetti L., Giraffa G. Rapid identification of dairy lactic acid bacteria by M13-generated, RAPD-PCR fingerprint databases // *Journal of Microbiological Methods.*— 2005.— Vol.63.— P. 135–144.

9. Giraffa G., Rossetti L., Neviani E. An evaluation of chelex-based DNA purification protocols for the typing of lactic acid bacteria // *Journal of Microbiological Methods.*— 2000.— Vol.42.— P. 175–184.

Резюме

У роботі наведено результати фізіолого-біохімічного і генетичного аналізу пробіотичних штамів *B. subtilis* УКМ В-5139 та УКМ В-5140. Виявлено відмінності між штамми у засвоєнні різних джерел живлення, а також у спектрах продуктів ампліфікації з праймерами до мікросателітних послідовностей. Показано, що використані маркери можна застосовувати для диференціації штамів *B. subtilis*.

В работе представлены результаты физиолого-биохимического и генетического анализа пробиотических штаммов *B. subtilis* УКМ В-5139 и УКМ В-5140. Выявлены отличия между штаммами в усвоении широкого ряда источников питания, а также в спектрах продуктов амплификации с праймерами к микросателлитным последовательностям. Показано, что использованные маркеры возможно применять для дифференциации штаммов *B. subtilis*.

Results of physiology-biochemical and genetic analysis of *B. subtilis* probiotic strains UCM В-5139 and UCM В-5140 have been performed in the research. Some differences between the strains in the utilization of a wide range of nutrient sources as well as in the pattern of products of amplification with primers to microsatellite sequences have been detected. It has been shown the markers revealed in the research could be used to differentiate *B. subtilis* strains.

КОЛОДЯЖНАЯ Я.С.

Universite Libre de Bruxelles, Bd. du Triomphe, CP242, Bruxelles, 1050, Belgique
e-mail: jsk@ngs.ru

Институт цитологии и генетики СО РАН, Россия, 630090. Новосибирск,
пр. Лаврентьева, 10

СТРАТЕГИИ ИССЛЕДОВАНИЯ МЕХАНИЗМОВ УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ К ТОКСИЧЕСКОМУ ВОЗДЕЙСТВИЮ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

Как известно, почвы в силу антропогенного влияния загрязнены тяжелыми металлами (ТМ), в число которых входят ртуть, кадмий, свинец, цинк, медь и некоторые другие. Попадая различными путями в атмосферу и почву,