

В.В. Круть, Л.А. ДанкевичІнститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України,
вул. академіка Заболотного, 154, Київ, Україна, 03143,
тел.: +38 (044) 526 11 79, e-mail: kroust.vol@gmail.com

ЖИРНОКИСЛОТНИЙ СКЛАД ЛІПІДІВ ЕНТОМОПАТОГЕННИХ ШТАМІВ БАКТЕРІЙ РОДУ *BACILLUS*

Метою досліджень був порівняльний аналіз жирнокислотного складу ліпідів ізольованих та колекційних штамів бактерій роду *Bacillus*. **Методи.** Склад жирних кислот клітинних ліпідів визначали методом газової хромато-мас-спектрометрії; обчислення середнього значення, стандартного відхилення і довірчого інтервалу здійснювали за допомогою Microsoft Excel. **Результати.** Вперше у жирнокислотних спектрах ізольованих *Bacillus* sp. та колекційних штамів *Bacillus thuringiensis* виявлено характерний для представників роду *Bacillus* набір жирних кислот з довжиною вуглецевого ланцюга від C_{10} до C_{18} атомів і зокрема великий вміст (понад 60–70% від загальної площі піків) розгалужених (*iso*- та *anteiso*- форм) жирних кислот. **Висновки.** За жирнокислотними профілями, виділені нами штами *Bacillus* sp. значно споріднені з колекційними штамом, що належать до виду *Bacillus thuringiensis*.

Ключові слова: *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus* sp., жирні кислоти, ідентифікація.

Ентомопатогенні властивості штамів *Bacillus thuringiensis* широко використовують у сільському господарстві з метою контролю листогризух шкідників, у молекулярній біології для створення безпечних генетично модифікованих культурних рослин та у епідеміології для контролю чисельності популяцій комах-переносників хвороб [2, 3, 6]. Нажаль, спектр вітчизняних біопрепаратів, є вкрай обмеженим [3]. Тому пошук нових штамів, а також напрямків і способів їх застосування є одним із найбільш важливих завдань для сучасної вітчизняної мікробіології та біотехнології. Зважаючи на зазначене вище, попередньо, нами із сільськогосподарських угідь, що не зазнавали впливу ні хімічних, ні біологічних препаратів було ізольовано більше 40 штамів бактерій роду *Bacillus*, з яких 9 мали ентомопатогенні властивості. Проведено первинну ідентифікацію їх за ключовими ознаками фенотипу та встановлено їх значну спорідненість з типовими представниками роду *Bacillus*, зокрема і виду *Bacillus thuringiensis* [1]. Але для уточнення їх видового статусу, на наш погляд, необхідно залучення інших ознак фенотипу. Тому, метою наших досліджень був аналіз жирнокислотного складу ліпідів ізольованих нами та колекційних штамів бактерій роду *Bacillus*.

© В.В. Круть, Л.А. Данкевич, 2017



Матеріали і методи

Об'єктами досліджень були штами, ізолювані нами із кишківника листогризучих комах, а саме із тканин личинок колорадського жука (*Leptinotarsa decemlineata*, ряд *Coleoptera*) та американського білого метелика (*Hyphantria cunea* Dryri, ряд *Lepidoptera*). Відбір комах проводили на полях приватних господарств та науково-дослідних установ на території Київської, Черкаської, Житомирської областей та АР Крим. Для порівняльного аналізу в роботі використано колекційні штами *B. thuringiensis* 297, 293, та 239, що були надані нам Патиною Т.І. (Національний університет біоресурсів та природокористування України). Колекційні штами *B. thuringiensis* В 5681, *B. megaterium* В 5714, *B. cereus* В 5650 та *B. sphaericus* В 5901, люб'язно надані з колекції відділу антибіотиків Інституту мікробіології і вірусології НАН України, та *B. thuringiensis* 98, що становить основу ентомоцидного препарату Бітоксубацилін [3], використали для порівняння.

Для визначення жирнокислотного складу ліпідів штами культивували на картопляному агарі протягом 24 годин при температурі 28 °С. Метилі ефіри жирних кислот отримували шляхом гідролізу клітин бактерій в 1,5% розчині сульфатної кислоти у метанолі протягом години за 80 °С з подальшою екстракцією сумішшю ефір-гексан (1:1) [5]. Склад метилових ефірів жирних кислот аналізували методом газової хроматографії хромато-мас-спектрометрії з використанням хромато-мас-спектрометричної системи Agilent 6800N/5973 inert (Agilent Technologies, США). Метилі ефіри жирних кислот ідентифікували з використанням бібліотеки мас-спектрів NIST 02 та за часом їх утримання із використанням стандарту метилових ефірів жирних кислот (47080-U, Supelco, США). Вміст жирних кислот виражали у відсотках від загальної суми площі піків. Повторність дослідів 3-х кратна. Статистичне опрацювання результатів (середнє значення, стандартне відхилення і довірчий інтервал) здійснювали за допомогою програмного забезпечення Microsoft Excel.

Результати та їх обговорення

В жирнокислотних спектрах досліджуваних штамів виявлені жирні кислоти з довжиною вуглецевого ланцюга від C_{10} до C_{18} , а саме: ненасичені – гексадецену ($C_{16:1}$) (до $6,61 \pm 1,1$), 15 – метил гексадецену ($C_{17:1 \text{ iso}}$) (до $4,51 \pm 0,1$) та *cis*-9 октадецену ($C_{18:1 \text{ cis } 9}$) (до $0,41 \pm 0,21$) кислоти; насичені – додекану ($C_{12:0}$) (до $1,92 \pm 0,1$), 11-метил додекану ($C_{13:0 \text{ iso}}$) (до $6,21 \pm 0,4$), тридекану ($C_{13:0}$) (до $1,82 \pm 0,1$), 12-метил тридекану ($C_{14:0 \text{ iso}}$) (від $5,56 \pm 0,1$ до $16,83 \pm 0,1$), тетрадекану ($C_{14:0}$) (до $8,23 \pm 0,3$), 13-метил тетрадекану ($C_{15:0 \text{ iso}}$) (від $3,72 \pm 0,1$ до $27,32 \pm 0,3$), 12-метил тетрадекану ($C_{15:0 \text{ anteiso}}$) (від $2,82 \pm 0,3$ до $42,92 \pm 0,1$), пентадекану ($C_{15:0}$) (до $1,33 \pm 0,1$), гексадекану ($C_{16:0}$) (від $2,83 \pm 0,1$ до $12,23 \pm 1,0$), 14-метил пентадекану ($C_{16:0 \text{ iso}}$) (від $4,49 \pm 0,3$ до $44,74 \pm 0,5$), 15-метил гексадекану ($C_{17:0 \text{ iso}}$) (до $13,51 \pm 1,0$), 14-метил гексадекану ($C_{17:0 \text{ anteiso}}$) (до $7,06 \pm 0,1$), октадекану ($C_{18:0}$) (слідові кількості).

Слід відмітити, що характерною особливістю жирнокислотних профілів як ізолюваних нами так і колекційних штамів є великий вміст розгалужених жирних кислот (*iso*- та *anteiso*- форми) (табл.), що згідно даних літератури властиво



Таблиця
Table

Жирнокислотний склад ліпідів колекційних та ізольованих штамів бактерій роду *Vacillus*

Cellular fatty acid composition of collection and isolated strains of the genus *Vacillus*

Жирна кислота*	Штам <i>Vacillus</i> sp.									<i>B. thuringiensis</i> 98	<i>B. thuringiensis</i> B 5681	<i>B. megaterium</i> B 5714	<i>B. cereus</i> B 5650 [†]	<i>B. sphaericus</i> B 5901 [†]	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9						
1		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
C _{12:0}	0,59	0,91	1,02	0,83	0,79	1,25	1,22	0,78	0,91	0,84	0,52	-	-	0,35	-
C _{13:0 iso}	1,62	1,18	1,18	1,31	2,08	1,60	1,44	1,81	1,52	1,44	6,21	-	-	1,56	-
C _{13:0}	1,90	1,54	1,31	1,51	2,04	1,64	1,46	1,81	1,78	1,01	1,06	-	-	1,82	-
C _{14:0 iso}	7,51	11,64	11,97	10,65	9,03	13,08	13,99	9,04	12,68	9,89	6,27	5,56	5,56	8,17	16,83
C _{14:0}	8,36	7,62	8,69	8,82	8,52	7,82	6,61	7,73	8,08	7,98	3,08	-	-	3,50	-
C _{15:0 iso}	14,57	11,62	9,68	11,21	12,99	10,79	10,22	12,63	12,10	12,08	27,32	13,33	13,33	22,38	3,72
C _{15:0 anteiso}	7,85	6,77	6,20	6,94	8,99	7,59	7,10	9,02	7,98	7,20	10,73	42,92	42,92	11,81	2,82
C _{15:0}	1,54	1,29	1,45	1,40	1,27	1,25	1,18	1,30	1,29	1,23	0,42	1,26	1,26	0,94	-
C _{16:1}	2,55	7,09	6,03	5,13	3,30	7,32	8,58	4,13	3,29	6,90	5,33	-	-	4,35	-
C _{16:0 iso}	8,50	12,15	13,89	11,38	9,06	11,73	12,74	9,04	12,98	9,76	4,49	12,15	12,15	8,86	44,74



Продовження таблиці

	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1														
C _{16:0 anteiso}	3,01	2,24	1,98	2,37	2,46	1,72	1,81	2,33	2,01	2,04	3,76	9,67	7,27	2,83
C _{16:0}	14,35	10,75	13,53	13,04	13,38	11,35	9,82	12,79	11,04	12,95	4,51	3,38	-	-
C _{17:1 iso}	17,36	16,87	16,02	16,46	16,14	14,98	15,28	17,69	17,99	16,01	12,26	10,62	2,80	-
C _{17:0 iso}	1,88	1,34	1,29	1,51	1,77	1,16	1,23	2,06	2,01	1,16	1,40	7,06	4,43	-
C _{17:0 anteiso}	0,48	-	-	0,30	-	-	-	-	-	-	сл.	-	сл.	-
C _{18:1 cis 9}	0,41	-	-	-	-	-	-	-	0,20	-	0,52	-	0,35	-
C _{18:0}	0,55	0,37	0,45	0,49	0,32	0,38	0,36	0,85	0,47	0,23	6,21	-	1,56	-
Сума ненасичених жирних кислот	20,32	23,96	22,05	21,59	19,44	22,3	23,86	21,82	21,48	22,91	18,11	10,62	7,05	-
Довжина вуглецевого ланцюгу	від C _{12:0} до C _{17:0}	від C _{12:0} до C _{17:0}	від C _{12:0} до C _{17:0}	від C _{12:0} до C _{17:0}	від C _{12:0} до C _{17:0}	від C _{12:0} до C _{17:0}	від C _{12:0} до C _{17:0}	від C _{12:0} до C _{17:0}	від C _{12:0} до C _{17:0}	від C _{12:0} до C _{17:0}	від C _{12:0} до C _{17:0}	від C _{14:0} до C _{17:0}	від C _{12:0} до C _{17:0}	від C _{14:0} до C _{16:0}

Примітка: * вміст жирних кислот вказаний у % від загальної площі піків, «сл.» – слідові кількості жирних кислот; «<->» – сполука не виявлена.
 Note: * The content of fatty acids shown in % of the peaks total area; “сл.” – trace amounts of fatty acids; “<->” – compound not found



для більшості видів у складі роду *Bacillus* [2, 4, 7, 8]. Зокрема, А. М. Остапчуком аналогічна закономірність була відмічена і при дослідженні комплексу генотипових та фенотипових властивостей штаму *Bacillus* sp. ONU14, що був віднесений до виду *B. thuringiensis* [2]. У виділених нами штамів вміст iso- та anteiso- форм жирних кислот становить близько 70%, що узгоджується з даними літератури. Зокрема, Л.А. Сафроною з колегами аналогічна закономірність відмічена при поліфазній таксономії штамів роду *Bacillus* з пробіотичними властивостями [4]. Автори відмітили великий вміст розгалужених жирних кислот (iso- та anteiso- форм пентадеканової та гептадеканової кислот), що становили близько 75–85% від загального жирнокислотного пулу [4]. Найбільш детально жирнокислотний склад клітинних ліпідів було досліджено Kaneda T [7]. Зокрема, він сформував основні закономірності жирнокислотних спектрів представників роду *Bacillus*. Так, за вмістом певних жирних кислот у профілях ключові види, що належать до цього роду можна поділити на шість груп (A–F). На його думку вирішальним для такої градації є вміст ненасичених, кількість певних розгалужених кислот та довжина вуглецевого ланцюгу наявних у спектрах жирних кислот. Так, групі E, до якої віднесено види *B. anthracis*, *B. cereus* і *B. thuringiensis* притаманна незначна кількість ненасичених жирних кислот (7–12%), домінування 13-метил тетрадеканової кислоти (19–31%) серед усіх розгалужених кислот і присутність у жирнокислотних спектрах кислот з 12–17 атомами вуглецю [7, 8], що не суперечить одержаним результатам.

Так, профілі жирних кислот ізольованих нами штамів загалом відповідають зазначеним вище закономірностям, зокрема: вміст ненасичених кислот складає (7,48%), 13-метил тетрадеканова кислота є переважальною і її кількість в середньому становить 16,5% від загальної площі піків. У складі жирних кислот клітинних ліпідів даних штамів переважають кислоти з довжиною вуглецевого ланцюгу від 12 до 17 атомів. Що правда, у жирнокислотних спектрах ізольованих штамів нами виявлено октадеканову жирну кислоту у кількостях менших за 1% від загальної площі піків. Крім того, дещо знижена кількість 13-метил тетрадеканової кислоти у ліпідах клітин ізольованих штамів, на наш погляд, може бути зумовлена методом екстрагування жирних кислот, умовами культивування тощо.

Отже, за згаданими вище характеристиками ізольовані нами штами *Bacillus* sp., штаму *B. thuringiensis* 98 та штами *B. thuringiensis* В 5681 і *B. megaterium* В 5714 досить споріднені. Натомість жирнокислотні профілі *B. megaterium* В 5714 та *Bacillus sphaericus* В 5901 мають дещо відмінні від наведених вище штамів характеристики жирнокислотних спектрів.

Таким чином, за результатами хемотаксономічного аналізу, ізольовані штами *Bacillus* sp. споріднені з окремими представниками роду *Bacillus*, зокрема виду *B. thuringiensis*. Враховуючи встановлену раніше значну подібність ключових морфолого-культуральних та фізіолого-біохімічних властивостей [1] ізольованих нами штамів *Bacillus* sp. та типових представників виду *B. thuringiensis* можна констатувати високу вірогідність належності ізольованих штамів до цього виду.



V.V. Krout, L.A. Dankevych

D.K. Zabolotny Institute of microbiology and virology of NAS of Ukraine,
154, Zabolotny str., 03143, Kyiv, Ukraine. tel.: +38 (044) 526 11 79,
e-mail: krout.vol@gmail.com

GENUS BACILLUS ENTOMOPATHOGENIC STRAINS FATTY ACID LIPID COMPOSITION

Summary

Aim. To conduct a comparative analysis of cellular fatty acids composition of isolated bacterial strains belongs to the genus *Bacillus*, that have pathogenic for insects properties, and some typical representatives of this family. **Methods.** Fatty acid composition of cellular lipids established by chromatography, gas chromatography-mass spectrometry; calculating the mean, standard deviation and the confidence interval was performed using Microsoft Excel. **Results.** In the fatty acid composition of all studied strains revealed typical of the genus *Bacillus* set of fatty acids with carbon chain length from C_{10} to C_{18} atoms and particularly high content (more than 60–70% of the total peak area) of the branched (iso- and anteiso- forms) fatty acids has been found for the first time. **Conclusions.** Fatty acid profiles isolated strains *Bacillus* sp. significantly similar with collection and typical strains belonging to the species *Bacillus thuringiensis*.

Key words: *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus* sp., fatty acid, identification.

В.В. Круть, Л.А. Данкевич

Институт микробиологии и вирусологии имени Д.К. Заболотного НАН Украины, ул. Заболотного,
154, 03143, Киев, Украина, тел.: +38 (044) 526 11 79,
e-mail: krout.vol@gmail.com

ЖИРНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ КЛЕТОЧНЫХ ЛИПИДОВ ЭНТОМОПАТОГЕННЫХ ШТАММОВ БАКТЕРИЙ РОДА *BACILLUS*

Реферат

Целью исследований был сравнительный анализ жирнокислотного состава липидов изолированных и коллекционных штаммов бактерий рода *Bacillus*. **Методы.** Состав жирных кислот клеточных липидов определяли методом газовой хромато-масс-спектрометрии; вычисление среднего значения, стандартного отклонения и доверительного интервала проводили с помощью Microsoft Excel. **Результаты.** Впервые в жирнокислотных спектрах изолированных *Bacillus* sp. и коллекционных штаммов *Bacillus thuringiensis* определен характерный для представителей рода *Bacillus* набор жирных кислот с длиной углеродной цепи от C_{10} до C_{18} атомов и в частности большое содержание (более 60–70% от общей площади пиков) разветвленных (iso- и anteiso- форм) жирных кислот. **Выводы.** По жирнокислотным профилям, выделенные нами штаммы *Bacillus*



*sp. значительно родственны коллекционным штаммам, которые принадлежат к виду *Bacillus thuringiensis*.*

*Ключевые слова: *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus sp.*, жирные кислоты, идентификация.*

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Круть В.В., Данкевич Л.А., Воцелко С.К., Патика В.П. Ідентифікація нових ентомопатогенних штамів бактерій роду *Bacillus* за ключовими ознаками фенотипу // *Агроекологічний журнал* – 2015. – № 2. – С. 112–116
2. Остапчук А.М. Молекулярно-біологічна характеристика та ідентифікація штаму *Bacillus sp.* ONU14 з ентомопатогенною активністю // *Мікробіологія і біотехнологія* – 2015. – № 1. – С. 6–13
3. Патика Т.І., Лісовий М.М., Патика М.В., Колодяжний О.Ю. Біоценологічні підходи при використанні ентомопатогенних бактерій *Bacillus thuringiensis* під час вегетації та в умовах зберігання продукції // *Мікробіологічний журнал* – 2016. – № 3 – С. 69–77.
4. Сафронова Л.А., Зелена Л.Б., Клочко В.В., Авдеева Л.В., Рева О.Н., Подгорский В.С. Гено- и фенотипическая характеристика штаммов бацилл – компонентов эндоспорина // *Мікробіологічний журнал* – 2012. – № 2. – С. 55–65.
5. Brian B.L., Gardner E.W. Preparation of bacterial fatty acid methyl esters for rapid characterization by gas–liquid chromatography // *Appl. Microbiol.* – 1967. – Vol. 15, № 6. – P. 1499–1500
6. Gonzalez A., Diaz R., Diaz M., Borrero Y., Bruzon R.Y., Carreras B., Gato R. Characterization of *Bacillus thuringiensis* soil isolates from Cuba, with insecticidal activity against mosquitoes // *Revista de biologia tropical* – 2011. – 59, N 3. – P. 1007–1016.
7. Kaneda T. Fatty acids on the genus *Bacillus*: an example of branched-chain preference // *Bacteriological reviews* – 1977. – N 2. – P. 391–418.
8. Slabbinck B., De Baets B., Dawyndt P., De Vos P. Towards large-scale FAME-based bacterial species identification using machine learning techniques // *Systematic and Applied Microbiology* – 2009. – № 32. – P. 163–176.

References

1. Krout VV, Dankevych LA, Votselko SK, Patyka VPh. Identification of new entomopathogenic strains which belongs to genus *Bacillus* on the basis of their key phenotypic features. *Agroecological journal*. 2015, 2, 112-116 (in Ukrainian)
2. Ostapchuk AM. Molecular – biological characteristics and identification of *Bacillus sp.* ONU14 strains with entomopathogenic activity. *Microbiology and biotechnology*. 2015, 1, 6-13 (in Ukrainian)
3. Patyka TI, Lesovoy NM, Patyka NV, Kolodjzhnyi AYU. Biocenotical approaches using entomopathogenic bacteria of *Bacillus thuringiensis* the season growing potatoes and storage. *Mikrobiologichny zhurnal*. 2016, 3, 69-77 (in Ukrainian)



4. Safronova LA, Zelena LB, Klochko VV, Avdeeva LV, Reva ON, Pidgorskyi VS. Genotype and phenotypic characteristics of *Bacillus* strains – components of endospores. *Mikrobiologichny zhurnal*. 2012, 5, 55-65 (in Russian).

5. Brian BL, Gardner EW. Preparation of bacterial fatty acid methyl esters for rapid characterization by gas-liquid chromatography. *Appl. Microbiol.* 1967, 15 (6), 1499–1500.

6. Gonzalez A, Diaz R, Diaz M, Borrero Y, Bruzon RY, Carreras B, Gato R. Characterization of *Bacillus thuringiensis* soil isolates from Cuba, with insecticidal activity against mosquitoes. *Revista de biologia tropical*. 2011. 59 (3), 1007–1016.

7. Kaneda T. Fatty acids on the genus *Bacillus*: an example of branched-chain preference. *Bacteriological reviews*. 1977, 2, P. 391 – 418.

8. Slabbinck B, De Baets B, Dawyndt P, De Vos P. Towards large-scale FAME-based bacterial species identification using machine learning techniques. *Systematic and Applied Microbiology*. 2009, 32, 163-176.

Стаття надійшла до редакції 17.10.2016 р.

