

Идентификация и дискриминация бактерий рода *Bacillus* методом MALDI-TOF MS

Калинин А.В., Котенева Е.А., Цыганкова О.И.

ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ставрополь; jugask@mail.ru

Общность филогенетического происхождения представителей рода *Bacillus*, значительная идентичность генома и некоторых фенотипических признаков доказывает необходимость проведения углубленных исследований различных аспектов биологических особенностей не только возбудителя сибирской язвы – *Bacillus anthracis*, но и других представителей рода *Bacillus* (1).

Основной средой обитания бактерий, принадлежащих к роду *Bacillus*, является почва. Почва - уникальная среда обитания микроорганизмов, она чрезвычайно гетерогенная по структуре и имеет микромозаичное строение. Чтобы правильно оценить роль почвы в экологии и эволюции бактерий следует понимать, что данный субстрат представляет собой совокупность множества очень мелких агрегатов, пронизанных порами, омываемыми почвенным раствором, протекающим по капиллярам. Остатки растений и животных, гумусовые вещества, распределены в ней неравномерно, а сосредоточены в отдельных микроочагах, где протекает бурная, но непродолжительная деятельность микробных сообществ, заселяющих эти участки (2).

Нами были охарактеризованы почвы Ставропольского края и близлежащих территорий юга России с точки зрения видового разнообразия обитающих в них представителей рода *Bacillus*. Тип почв определялся в соответствии атласом почв РФ Ставропольского края (3). В местах забора образцов для анализа снимались координаты для последующей их привязки к карте. Образцы отбирались с глубины 10-15 см, поверхность почвы очищалась от растений, их гнилых остатков и прочего мусора. Забор образцов почвы осуществлялся в наиболее перспективных местах: скотопрогонных трассах, склонов гор, лугов, в местах с высоким содержанием органических веществ. Для сравнения брались образцы с глинистых почв, солончаков, прибрежного ила.

Из полученных проб почвы делались водные суспензии, измерялся pH полученного раствора, эти суспензии высевались на HiCrome™ *Bacillus* Agar (HIMEDIA) методом пересева на 3 чашки. HiCrome™ *Bacillus* Agar является дифференцирующей средой для бактерий рода *Bacillus*, на основе ферментации среды, цвета колоний, их морфологии далее осуществляли пересев колоний вновь на HiCrome™ *Bacillus* Agar для получения чистой культуры из отобранных колоний. Данная дифференциальная среда прежде всего, позволяет визуально разделить культуры для последующего пересева. Полученная чистая культура пересевалась на LB-агар для дальнейшей характеристики культуры бактериологическими и молекулярными методами.

В ходе работы было проанализировано 86 образцов почв, отобранных с территории Ставропольского края и в сопредельных областях юга России. Было идентифицировано более 400 культур, из них 337 принадлежат к 26 видам рода *Bacillus*.

Табл. 1: Список идентифицированных бактерий рода *Bacillus*.

Идентификация		Количество выделенных культур	Идентификация		Количество выделенных культур
№:	Бациллы:		№:	Бациллы:	
1.	<i>Bacillus anthracis</i>	4	14.	<i>Bacillus siamensis</i>	8
2.	<i>Bacillus asahii</i>	1	15.	<i>Bacillus simplex</i>	12
3.	<i>Bacillus badius</i>	1	16.	<i>Bacillus sonorensis</i>	3
4.	<i>Bacillus cereus</i>	73	17.	<i>Bacillus cereus</i> sp.	43

5.	<i>Bacillus firmus</i>	2	18.	<i>Bacillus sporothermodurans</i>	1
6.	<i>Bacillus halotolerans</i>	22	19.	<i>Bacillus subtilis</i>	10
7.	<i>Bacillus horneckiae</i>	1	20.	<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	4
8.	<i>Bacillus idriensis</i>	1	21.	<i>Brevibacillus laterosporus</i>	1
9.	<i>Bacillus licheniformis</i>	31	22.	<i>Brevibacillus parabrevis</i>	2
10.	<i>Bacillus marisflavi</i>	2	23.	<i>Lysinobacillus boronitolerans</i>	5
11.	<i>Bacillus megaterium</i>	31	24.	<i>Lysinobacillus fusiformis</i>	4
12.	<i>Bacillus pseudomycooides</i>	20	25.	<i>Lysinobacillus sphaericus</i>	1
13.	<i>Bacillus pumilis</i>	52	26.	<i>Viridibacillus neidei</i>	2

Основным методом идентификации культур была MALDI TOF масс-спектрометрия на базе прибора Microflex LRF Bruker, в программной среде Biotyper RTC (v.3.1). Это быстрый и чувствительный метод, позволяющий не только идентифицировать неизвестную культуру, но и дискриминировать ее от близкородственных видов, что является неоспоримым преимуществом метода MALDI TOF (3). Пробы готовили лизисом 18 ч. вегетативной культуры в 80% ТФУ с последующей ультрамикрочентрифужной фильтрацией. Сбор спектров осуществлялся в автоматическом режиме, со стандартными параметрами настройки прибора, калибровка с помощью BTS стандарта (Bruker Test Standard). Для идентификации использовалась коммерческая база данных компании Bruker (версия Bruker Taxonomy V 7.0.0.0_6903-7311) и лабораторная in-house MSP библиотека масс-спектров штаммов представителей рода *Bacillus*. Обработка и отбор спектров для последующего пополнения MSP in-house библиотеки новыми видами бацилл или увеличения уже существующей выборки, осуществлялась в программной среде FlexAnalysis (v. 3.3) и Biotyper (v. 3.1).

Сохранение выделенных культур позволит использовать их при тестировании на специфичность тест-систем и препаратов для диагностики сибирской язвы, а также оценить устойчивость (однородность) фенотипических свойств внутри видовых групп бацилл. Все полученные данные, включая фотографические материалы будут оформлены в виде электронной базы и могут быть использованы при видовой идентификации представителей рода *Bacillus*.

Литература

1. Okinaka R., Pearson T., Keim P. Anthrax, bat not *Bacillus anthracis*? // PLoS Pathog. – 2006. – 2(11): e112.
2. Мусаев Ф.А., Захарова О.А. Бактериальные сообщества в почве сельскохозяйственного назначения: Монография. – Рязань: РГАТУ, 2014. – 205с.
3. Singhal N, Kumar M, Kanaujia PK, Viridi JS. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front Microbiol.* 2015; 6:791. Published 2015 Aug 5. doi:10.3389/fmicb.2015.00791