

ФІЛОГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ ШТАМІВ-ПРОДУЦЕНТІВ ЛІЗИНУ ПОРІВНЯННЯМ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ ГЕНА 16S рРНК

Г. С. Андріяш¹
Г. М. Заболотна¹
В. С. Бондаренко²
С. М. Шулга¹

¹ДУ «Інститут харчової біотехнології і геноміки
НАН України», Київ

²ННЦ «Інститут біології» Київського національного
університету імені Тараса Шевченка, Україна

E-mail: Shulga5@i.ua

Отримано 30.07.2014

Досліджено філогенетичні зв'язки штамів-продуцентів незамінних амінокислот аспартатної родини *Brevibacterium* sp. УКМ Ас-674 (*Brevibacterium* sp. 90), *Brevibacterium* sp. ІМВ Ас-5004 (*Brevibacterium* sp. 90Н), *Brevibacterium* sp. УКМ Ас-675 (*Brevibacterium* sp. Е531) та мутантного штаму ІМВ В-7447 із «Колекції штамів мікроорганізмів і ліній рослин для харчової та сільськогосподарської біотехнології» ДУ «Інститут харчової біотехнології і геноміки НАН України». За секвенованою послідовністю гена 16S рРНК підтверджено належність дослідженого мутантного штаму ІМВ В-7447 до роду *Brevibacterium*.

Побудовано дендрограму філогенетичних зв'язків досліджених штамів і споріднених з ними штамів бревібактерій. Показано, що за рівнем гомології послідовностей гена 16S рРНК ці штами-продуценти належать до трьох філогенетичних груп.

Встановлено, що послідовність гена 16S рРНК мутантний штам *Brevibacterium* sp. ІМВ В-7447 не має аналогів у базі даних GenBank.

Ключові слова: *Brevibacterium*, ген 16S рРНК.

Потреби різних галузей промисловості зумовлюють інтенсифікацію виробництва амінокислот, що супроводжується впровадженням нових та вдосконаленням існуючих технологій, пошуком дешевих субстратів і більш продуктивних штамів [1].

Особлива увага до бактерій *Brevibacterium* пояснюється тим, що серед промислових штамів-продуцентів незамінних амінокислот понад 90% належить саме до цього роду [1, 2]. Видова ідентифікація цих бактерій тривалий час базувалася на морфологічних відмінностях, використанні діагностики та біохімічного аналізу. Такі дослідження давали неоднозначні результати, особливо у випадках споріднених родів і видів мікроорганізмів [3]. З огляду на неприпустимість подібних відхилень правильне визначення систематичного положення мікроорганізмів є важливим і невід'ємним етапом у їх практичному застосуванні.

Серед наявних методів сучасної систематики прокаріотів молекулярно-філогенетич-

на класифікація, що ґрунтується на порівнянні нуклеотидних послідовностей генів та побудові філогенетичних дендрограм, адекватно відображає філогенетичні зв'язки досліджуваних мікроорганізмів.

Деякі гени «домашнього господарства» (housekeeping genes) можуть бути використані для філогенетичного аналізу, однак більшість із них або недостатньо поширені, або занадто швидко змінюються під впливом зовнішнього середовища чи паралельно переносяться.

У філогенетичних дослідженнях бактерій використання гена 16S рРНК є досить ефективним, оскільки його функції практично не змінилися у процесі еволюції.

Метою роботи було визначення та підтвердження таксономічного положення дослідженого мутантного штаму-продуцента лізину *Brevibacterium* sp. ІМВ В-7447 [4], який продукує амінокислоту в концентрації в 5 разів більшій, ніж вихідний (батьківський) штам-продуцент *Brevibacterium*

sp. 90 із «Колекції штамів мікроорганізмів і ліній рослин для харчової та сільськогосподарської біотехнології» (далі Колекція) ДУ «Інститут харчової біотехнології і геноміки НАН України», визначення послідовностей гена 16S рРНК штамів-продуцентів лізину з Колекції та встановлення їх філогенетичного положення в межах найбільш споріднених штамів роду *Brevibacterium* із бази даних GenBank [5].

Матеріали і методи

Об'єктами досліджень були ауксотрофні (лейцинозалежні) штами-продуценти лізину *Brevibacterium* sp. 90 Н, *Brevibacterium* sp. 90, *Brevibacterium* sp. Е 531 та мутантний штам *Brevibacterium* sp. ІМВ В-7447 із Колекції.

Умови культивування та середовища. Для вирощування штамів-продуцентів лізину використовували повноцінні живильні середовища (ППС) такого складу: м'ясо-пептонний агар (МПА) (г/дм³): поживний бульйон — 23,0, агар — 30,0, вода дистильована, рН 7,0 ± 0,1, та м'ясо-пептонний агар збагачений (МПАзб.) (г/дм³): поживний бульйон — 23,0, глюкоза — 1,0, дріжджовий екстракт — 5,0, агар — 30,0, вода дистильована, рН 7,0 ± 0,1 [1].

Реактиви. Приготування реагентів для біохімічних та електрофоретичних досліджень здійснювали на основі очищеної деіонізованої води (система DIRECT Q3, Millipore, Франція).

ДНК виділяли за допомогою відповідного набору реагентів (Fermentas, Литва). Для електрофорезу використовували агарозу (Sigma, США), бромід етидію (базовий розчин концентрацією 10 г/дм³) та бромфеноловий синій (Sigma, США).

Для виділення ДНК клітини бактерій брали з одностовової культури на МПБзб. за температури 30 ± 1 °С в умовах аерації за 220 хв⁻¹ (шейкер BIOSAN ES-20, Латвія).

Виділяли ДНК за стандартною процедурою для грампозитивних бактерій згідно з [6]. Для більш ефективного лізису клітин додавали 1% лізоциму (10 мг/мл). Виділену ДНК досліджували горизонтальним електрофорезом та ПЛР [7–10]. Електрофоретичне розділення ДНК проводили в 1% -му агарозному гелі в трис-ацетатній буферній системі. Молекулярну масу фрагментів ДНК визначали за їхньою електрофоретичною рухливістю, використовуючи маркер 1kb — ДНК (1kb Fermentas SM1163) [7].

Умови проведення ПЛР. Ампліфікацію гена 16S рРНК здійснювали за допомогою

універсальних бактеріальних праймерів 27f та 907r (27F 5'-AGA GTT TGA TGG CTC AG-3'; 907r 5'-CCG TCA ATT CCA TTT GAG TTT-3'). ПЛР проводили на ампліфікаторі Mastercycler personal 5332 (Eppendorf, США). Реакційна суміш складалася з одноразового ПЛР-буфера із сульфатом амонію, 0,2 мкМ відповідних праймерів, 200 мкМ кожного з дезоксинуклеотидтрифосфатів, 0,5 од. Тақ-полімерази (Fermentas, Литва), 2,0 мМ хлориду магнію, 10–50 нг ДНК-проби. Загальний об'єм реакційної суміші дорівнював 20 мкл.

Умови ампліфікації: початкова денатурація за Т = 95 °С — 3 хв; 32 цикли ампліфікації (Т = 94 °С — 30 с, Т = 57 °С — 45 с, Т = 72 °С — 30 с); кінцева елонгація відбувалася за Т = 72 °С протягом 5 хв [11]. Електрофоретичне розділення продуктів ампліфікації проводили в трис-ацетатному буфері. Фрагмент виділяли з агарозного гелю за допомогою набору «Macherey-Nagel NucleoSpin Extract» згідно з інструкцією фірми-виробника.

Після ампліфікації генів нуклеотидну послідовність амплікона визначали за допомогою сиквенатора ABI PRISM 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems, США). Результуючий континг сиквенування одержували, порівнюючи пряму та зворотнотемплентарну послідовності з використанням програми CLC Main Workbench (CLC bio). Гомологічні послідовності відбирали з бази даних GenBank [5].

Порівняльний аналіз нуклеотидних послідовностей. Філогенетичний аналіз. Із бази даних GeneBank було відібрано послідовності гена 16S рРНК різних представників родини бревібактерій, що мають найбільший рівень нуклеотидної подібності до сиквенованих фрагментів гена 16S рРНК досліджуваних штамів-продуцентів лізину. Для з'ясування систематичного положення цих штамів зі спорідненими було проведено вирівнювання відповідних нуклеотидних послідовностей у програмі ClustalW [12] і побудовано дендрограму філогенетичних зв'язків. Філогенетичний аналіз здійснено у програмі MEGA6 [13, 14].

Результати та обговорення

Для порівняння штамів-продуцентів лізину та мутантного штаму з Колекції зі спорідненими штамми було виділено ДНК цих бактерій і визначено нуклеотидну послідовність гена 16S рРНК. Чистоту виділеного фрагмента ДНК перевірили за допомогою електрофорезу (рис. 1).

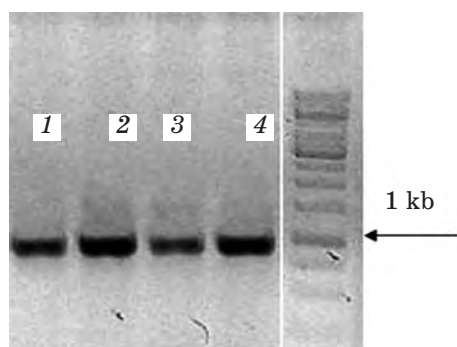


Рис. 1. Електрофореграма фрагмента гена 16S рРНК (27f-907r):

- 1 — *Brevibacterium* sp. IMB B-7447;
2 — *Brevibacterium* sp. E531;
3 — *Brevibacterium* sp. 90;
4 — *Brevibacterium* sp. H

Ампліфікацію гена 16S рРНК здійснювали з використанням універсальних бактеріальних праймерів 27f та 907r з подальшим сиквенуванням.

Отримані послідовності гена 16S рРНК штамів *Brevibacterium* sp. 90, *Brevibacterium* sp. 90H, *Brevibacterium* sp. E531, *Brevibacterium* sp. IMB B-7447 було вирівняно одну відносно одної в програмі ClustalW, як наведено нижче:

***Brevibacterium* sp. 90**

GCTGGCGGCGTGTCTTAACACATGCAAGTC
GAACGCTGAAGCACTGTGCTTGACGGTGTG
GATGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTG
AGTAACCTGCCCCTGAATTCGGGATAAGCTT
GGGAAACTGGGTCTAATACCGGATGTGACTA
CTGGCCGCATGGTCTGGTGGTGGAAAGGGTT
TACTGGTTGGGGATGGAATCGCGGCCTATC
AGTTTGTGGTGGGGTAGTGGCCTACCAAGA
CGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGAC
CGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGA
CTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTG
CACAATGGGGGGAACCTGATGCAGCGACGC
CGCGTGCGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAA
ACCGCTTTCAGTAGGGAAGAAGCGAAAAGTG
ACGGTACCTGCAGAAGAAGTACCGGCTAAT
ACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGT
ACAAGCTTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAA
GAGCTCGTAGGTGGTTGGTCGCGTCTCCTGTG
GAAACGCAACGCTTAACGTTGCGCGTGCAGT
GGGTACGAGCTGACTAGAGTGCAGTAGGGG
AGTCTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAAT
GCGCAGATATAAGGAGGAACACCGGTGGCG
AAGGCGGGACTCTGGGCTGTAAGTACGCT
GAGGAGCGAAAGCATGGGGAGCGAACAGG
ATTAGATACCTGGTAGTCCATGCCGTAAC
GTTGGGAACTAGGTGTGGGGTCCGTTCCACG
GATTCGCTGCCGAGTAACGCATTAAGTTCC
CCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAA
CTCAAAGGAATTGACGGGGGCC

***Brevibacterium* sp. 90H**

CGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAAC
CTGCCCTGACTTCGGGATAAGCCCGGGAA
ACTGGGTCTAATACCGGATACGACTGCCGG
ACGCATGTCTGGTGGTGGAAAGTTTTTCG
GTTGGGGATGGGCTCGCGGCCTATCAGTTT
GTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGACGAC
GACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGG
CCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACT
CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTG
CACAATGGGGGAAACCTGATGCAGCGAC
GCAGCGTGCGGGATGACGGCCTTCGGGTTG
TAAACCGCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGCA
AGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGTACCGG
CTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC
GTAGGGTACGAGCGTGTCCGGAATTATTG
GGCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGTTGGTCAC
GTCTGCTGTGGAAACGCAACGCTTAACGTT
GCGCGTGCAGTGGGTACGGGCTGACTAGAG
TGCAGTAGGGGAGTCTGGAATTCCTGGTGT
AGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGA
ACACCGGTGGCGAAGGCGGGACTCTGGGCT
GTAAGTACACTGAGGAGCGAAAGCATGG
GGAGCGAACAGGATTAGATACCTGGTAG
TCCATGCCGTAAACGTTGGGCACTAGGTGT
GGGGGGCATTCACGTTCTCCGCGCCGTAG
CTGACGCATTAAGTGCCCCGCTGGGGAGT
ACGGTTCGAAGCCTGGTGTCTGCACCGGGT
GGATGAGTGG

***Brevibacterium* sp. E 531**

CCCTTCAGCTTGCTGGGAGTGTGGTTG
AGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGT
AACCTGCCCTCCACTTCGGGATAAGCTTGG
GAAACTGGGTCTAATACCGGATACGACCA
GCCGAGGCATCTTGTGTTGGTGGAAAGTTT
TTTCGGTGGGGGATGGGCTCGCGGCCTATC
AGCTTGATGGTGGGGTAATGGCCTACCATG
GCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCG
ACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCC
AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAT
ATTGCACAATGGGGGGAACCTGATGCAGC
GACGCAGCGTGGGGATGACGGCCTTCGGG
TTGTAAACCGCTTTCAGCAGGGAAGAAGCG
GAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGTACC
GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAAT
ACGTAGGGTACGAGCGTTGTCCGGAATTAT
TGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGTTGGTC
GCGTCTGCTGTGGAAACGCAACGCTTAACG
TTGCGCGTGCAGTGGGTACGGGCTGACTAG
AGTGCAGTAGGGGAGTCTGGAATTCCTGGT
GTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAG
GAACACCGGTGGCGAAGGCGGGACTCTGGG
CTGTGACTGACACTGAGGAGCGAAAGCATG
GGGAGCGAACAGGATTAGATACCTGGTA
GTCCATGCCGTAAACGTTGGGCACTAGGTG
TGGGGGGCATTCACGTTCTCCGCGCCGTAG
CTAACGCATTAAGTGCCCCGCTGGGGAGT

ACGGTCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAAT
TGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCAT
GCGGATTAATTCGATGCAACGCTTAACACA
TGCAAGTCGAACGCGAC

***Brevibacterium* sp. IMB B-7447**

GCTGGCGGCGACACATGCAAGTCGAAC
GCTGAAGCACTGTGCTTGACGGGTGTGGAT
GAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAG
TAACCTGCCCTGACTTCGGGATAAGCTTG
GGAACTGGGTCTAATACCGGATGTGACTA
CTGGCCGCATGGTCTGGTGGTGGAAAGGGT
TTTACTGGTTGGGGATGGACTGCTTATCGC
GGCCTATCAGTTTGTGGTGGGGTAGTGGC
CTACCAAGACGACGACGGGTAGCCGGCCTG
AGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGA
CACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAG
TGGGGAATATTGCACAATGGGGGGAGCAG
CGACGCCGCGTGCGGGATGACGGCCTTCGG
GTTGTAAACCGCTTTCAGTAGGGAAGAAG
CGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGTA
CCGGCTAATACGTGCCAGCAGCCGCGGTAA
TACGTAGGGTACAAGCTTTGTACCCTGATC
CGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAG
GTGGTTGGTTCGCGTCTCCTGTGGAAACGCA
ACGCTTAACGTTGCGCGTGAGTGGGTACG
AGCTGACTAGAGTGACGTAGGGGAGTCTGG
AATTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGGATA
TAAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGG
ACTCTGGGCTGTAACGACGCTGAGGAGCG
AAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATA
CCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGGGGAAC
TAGGTGTGGGGTCCGTTCCACGGATTCCGT

GCCGGAGTAACGCATTAAGTTCCCCGCCTG
GGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAA
AGGAATTGACGGGGGGCCCTT

Секвеновані послідовності відповідають такому положенням у гені 16S рРНК: 18-898, 87-868, 75-938, 34-898 для *Brevibacterium* sp. 90, *Brevibacterium* sp. 90H, *Brevibacterium* sp. E531 та *Brevibacterium* sp. IMB B-7447, відповідно.

Для встановлення родинних зв'язків здійснено філогенетичний аналіз і побудовано філогенетичне дерево. Мірою відповідності набору вирівняних послідовностей даної топології дерева вважають міру (критерій), що ґрунтується на принципі найбільшої правдоподібності. Було досліджено дендрограму філогенетичних зв'язків штамів *Brevibacterium* sp. 90, *Brevibacterium* sp. 90H, *Brevibacterium* sp. E531 та *Brevibacterium* sp. IMB B-7447 із Колекції і філогенетично близьких представників роду *Brevibacterium*.

Нижче наведено філогенетичне дерево з найвищим значенням логарифма подібності (log-likelihood value) — 2018,5, побудоване за допомогою методу максимальної правдоподібності (maximum likelihood) з використанням моделі Tamura-Nei [13] для оцінювання еволюційної відстані. Кількість повторів (bootstrap) — 1000 (рис. 2). Філогенетичне дерево, побудоване іншим статистичним методом — приєднання сусідів (Neighbor-joining), — мало таку саму топологію.

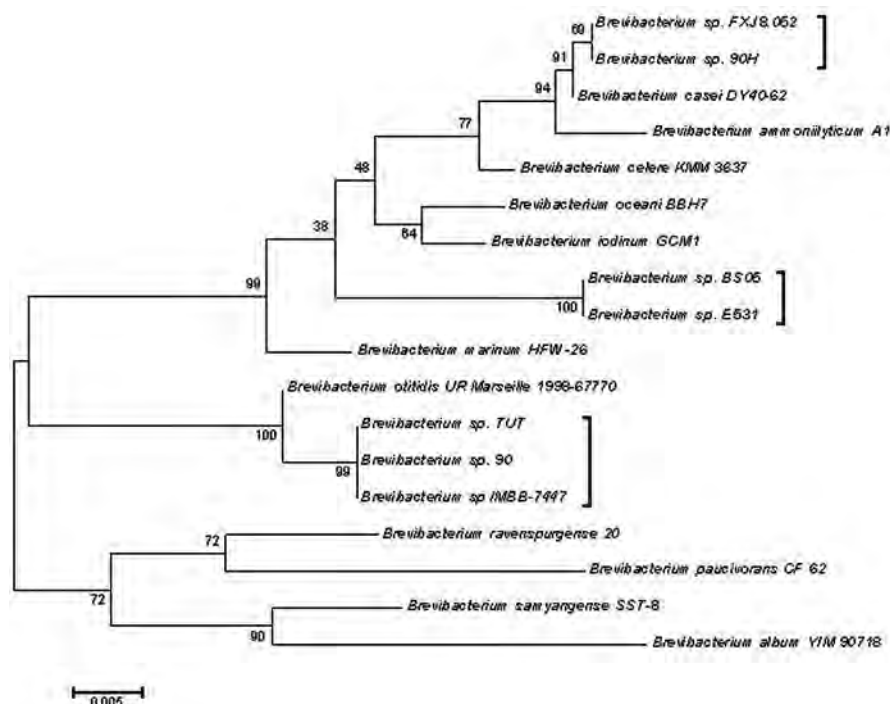


Рис. 2. Дендрограма філогенетичних зв'язків деяких представників роду *Brevibacterium*

Із дендрограми випливає, що штами з Колекції за рівнем філогенетичної спорідненості за геном 16S рРНК належать до трьох груп. Перша — *Brevibacterium* sp. 90Н, *Brevibacterium* sp. FXJ8.052, *Brevibacterium casei* DY 40-62, *Brevibacterium ammoniilyticum* A1; друга — *Brevibacterium* sp. E531, *Brevibacterium* sp. BS05; третя — *Brevibacterium* sp. 90, *Brevibacterium* sp. TUT та мутантний штам *Brevibacterium* sp. IMB B-7447.

Результати свідчать про філогенетичну гетерогенність досліджених штамів бревібактерій і підтверджують належність мутантного штаму *Brevibacterium* sp. IMB B-7447 до роду *Brevibacterium*. Показано, що подібність сиквенованих фрагментів гена 16S рРНК *Brevibacterium* sp. IMB B-7447 та вихідного штаму *Brevibacterium* sp. 90 становила 98% (обидва розташовані в межах однієї групи), а мутантний штам *Brevibacterium* sp. IMB B-7447 не має аналогів у базі даних GenBank.

Збільшення накопичення лізину мутантним штамом *Brevibacterium* sp. IMB B-7447 відбувається, можливо, внаслідок зміни

ключових генів (*pus*, *lysC*, *hom*, *dapA*, *mgo*) в результаті мутагенезу.

Таким чином, молекулярно-філогенетичним аналізом послідовностей гена 16S рРНК підтверджено належність штамів-продуцентів незамінних амінокислот аспартатної родини з Колекції до роду *Brevibacterium* і встановлено філогенетичні зв'язки цих штамів та споріднених з ними штамів бревібактерій із бази даних GenBank. Показано, що подібність гена 16S рРНК *Brevibacterium* sp. IMB B-7447 та вихідного штаму *Brevibacterium* sp. 90 становила 98%. Мутантний штам *Brevibacterium* sp. IMB B-7447 належить до роду *Brevibacterium*. Послідовність гена 16S рРНК мутантного штаму *Brevibacterium* sp. IMB B-7447 не має аналогів у базі даних GenBank.

Автори висловлюють подяку к. б. н. Кваско О. Ю. за допомогу в здійсненні аналізу геномної ДНК.

REFERENCES

1. Andriiash G. S., Zabolotna G. M., Shulga S. M. Regulation and intensification ways of lysine biosynthesis. *Mikrobiologiya ta biotekhnologiya*. 2012, V. 4, P. 6–17 (In Ukrainian).
2. Andriiash G. S., Zabolotna G. M., Shulga S. M. Auxotrophy of producers of lysine *Brevibacterium* sp. *Biotechnologia Acta*. 2012, 1 (4), 70–77 (In Ukrainian).
3. Borshchevskaya L. N., Kalinina A. N., Sineokii S. P. Design of a PCR-test based on the *gyrA* gene sequence for identification of closely relative species of the *Bacillus subtilis* group. *Biotechnologia*. 2012, V. 3, P. 32–43 (In Russian).
4. Andriiash G. S., Zabolotna G. M., Shulga S. M. The mutant strains of microorganisms — producers of lysine and threonine. *Biotechnologia Acta*. 2014, 3 (7), 95–101.
5. GenBank (Base sequences of DNA) URL: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>
6. Wilson K. Preparation of Genomic DNA from bacteria. *Current protocol in Molecular biology*. 2001, 2.4.1–2.4.5.
7. Fedorenko V., Ostash B., Rebets Y., Gonchar M. Large workshop on genetics, genetic engineering and biotechnology analysis of microorganisms. *Lviv*. 2006, P. 185–188, 193–196. (In Ukrainian).
8. Martinenko O. I. Methods of molecular biotechnology: Laboratory workshop. *Kyiv*. 2010, P. 212–215, 221–223 (In Ukrainian).
9. Edwards K. Real-time PCR: An essential guide. K. Edwards, Logan J., Saunders N., Wymondham. *Horizon Bioscience*. 2004, 346 p.
10. Melnichuk M. D. Biotechnology of plants. D. Melnichuk, T. V. Novak, V. A. Kunach. *Kyiv: Poligraphconsalting*. 2003, 520 p.
11. Guttel R., Larsen N., Woese C. Lessons from an evolving rRNA: 16S and 23S rRNA structures from a comparative perspective. *Microbiol. Rev.* 1994, 8 (1), 10–24.
12. Thompson J. D., Higgins D. G., Gibson T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 1994, 22 (22), 4673–4680.
13. Tamura K., Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* 1993, V. 10, P. 512–526.
14. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 2013, V. 30, P. 2725–2729.

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ШТАММОВ-ПРОДУЦЕНТОВ ЛИЗИНА СРАВНЕНИЕМ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ГЕНА 16S рРНК

А. С. Андрияш¹
Г. М. Заболотная¹
В. С. Бондаренко²
С. М. Шулга¹

¹ГУ «Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины», Киев

²НУЦ «Институт биологии» Киевского национального университета имени Тараса Шевченко, Украина

E-mail: Shulga5@i.ua

Исследованы филогенетические связи штаммов-продуцентов незаменимых аминокислот аспартатного семейства *Brevibacterium* sp. УКМ Ac-674 (*Brevibacterium* sp. 90), *Brevibacterium* sp. ИМВ Ac-5004 (*Brevibacterium* sp. 90H), *Brevibacterium* sp. УКМ Ac-675 (*Brevibacterium* sp. E531) и мутантного штамма *Brevibacterium* sp. ИМВ B-7447 из «Коллекции штаммов микроорганизмов и линий растений для пищевой и сельскохозяйственной биотехнологии» ГУ «Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины». По секвенированной последовательности гена 16S рРНК подтверждена принадлежность полученного мутантного штамма ИМВ B-7447 к роду *Brevibacterium*.

Построена дендрограмма филогенетических связей исследованных штаммов и близкородственных к ним штаммов бревибактерий из баз данных GenBank. Показано, что по уровню гомологии последовательности гена 16S рРНК исследованные штаммы-продуценты относятся к трем филогенетическим группам.

Установлено, что мутантный штамм *Brevibacterium* sp. ИМВ B-7447 не имеет аналогов в базе данных GenBank.

Ключевые слова: *Brevibacterium*, ген 16S рРНК.

GENE 16S rRNA SEQUENCE PHYLOGENETIC ANALYSIS OF LYSINE PRODUCERS STRAINS

G. S. Andriash¹
G. M. Zabolotna¹
V. S. Bondarenko²
S. M. Shulga¹

¹State organization «Institute of Food Biotechnology and Genomics» of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

²SEC «Institute of Biology» of Taras Shevchenko Kyiv National University, Ukraine

E-mail: Shulga5@i.ua

The phylogenetic relationships of strains-producers of essential amino acids of aspartate family *Brevibacterium* sp. UCM Ac-674 (*Brevibacterium* sp. 90), *Brevibacterium* sp. IMV Ac-5004 (*Brevibacterium* sp. 90H), *Brevibacterium* sp. UCM Ac-675 (*Brevibacterium* sp. E531), mutant strain *Brevibacterium* sp. IMV B-7447 from the «Collections strains and lines of plants for food and agricultural biotechnology» SO «Institute for Food Biotechnology and Genomics of National Academy of Sciences of Ukraine» were investigated. The affiliation strain *Brevibacterium* sp. IMV B-7447 to the genus *Brevibacterium* within the sequences of the genes based on 16S rRNA was confirmed.

The dendrogram of phylogenetic relationships of studied strains and related strains *Brevibacterium* from database GenBank was constructed. It was shown that by the criterion of homology gene sequences based on 16S rRNA the investigated strains-producers belong to three phylogenetic groups.

It was established that the mutant strain *Brevibacterium* sp. IMV B-7447 has no analogues in the database GenBank.

Key words: *Brevibacterium*, gene 16S rRNA.