

ПОЛІФАЗНИЙ ТАКСОНОМІЧНИЙ АНАЛІЗ ШТАМУ *BACILLUS* SP. С6 — АНТАГОНІСТА ФІТОПАТОГЕННИХ МІКРООРГАНІЗМІВ

Г.Ю. ГРАБОВА, І.В. ДРАГОВОЗ, Л.Б. ЗЕЛЕНА, А.М. ОСТАПЧУК, Л.В. АВДЄЄВА

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Київ
E-mail: gau.imv@ukr.net

Проведено поліфазний таксономічний аналіз штаму *Bacillus* sp. С6 — антагоніста фітопатогенних бактерій і мікроміцетів. Встановлено, що за сукупністю культурально-морфологічних і фізіолого-біохімічних властивостей штаму належить до групи *Bacillus subtilis*. Показано, що жирні кислоти клітинних стінок штаму представлені переважно розгалуженими ізота антеїзо-С15:0 і С17:0 жирними кислотами (понад 85 %), що характерно для виду *Bacillus amyloliquefaciens*. При проведенні молекулярно-генетичного аналізу нуклеотидної послідовності фрагмента гена *16S рРНК*, а також при вивченні профілю поліморфних нуклеотидів штаму віднесено до підвиду *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*.

Ключові слова: *Bacillus* sp. С6, культурально-морфологічні ознаки, фізіолого-біохімічні властивості, жирнокислотний склад, молекулярно-генетичний аналіз, ідентифікація.

Вступ. На сьогоднішній день загальноприйнятим вважається, що для ідентифікації та характеристики виду бактерій необхідно використовувати різні методичні підходи. Поєднання різноманітних методів, пов'язаних з аналізом фенотипових і геномних властивостей з метою встановлення таксономічного положення, визначають як поліфазний аналіз [1–5].

Бактерії роду *Bacillus* широко поширені в природі, що зумовлює внутрішньовидову гетерогенність, а також їх високий біосинтетичний потенціал. Здатність бацил синтезувати широкий спектр вторинних метаболітів з високою біологічною активністю робить можливим застосування їх при створенні біопрепаратів, зокрема для рослинництва. Складність при ідентифікації бактерій роду *Bacillus* полягає у відсутності чітких відмінностей між видами за фенотиповими ознаками. Крім того, з розвитком молекулярно-генетичних методів досліджень систематика бацил істотно змінилася [6]. Так, вид *Bacillus subtilis* був розділений на кілька спо-

віднених видів і підвидів: *B. amyloliquefaciens* (який в свою чергу поділено на підвиди *B. amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* і *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*), *B. atrophaeus*, *B. axarquiensis*, *B. malacitensis*, *B. mojaviensis*, *B. vallismortis* і *B. velezensis* і, власне, *B. subtilis* (включає підвиди *B. subtilis* subsp. *subtilis* і *B. subtilis* subsp. *spizizenii*).

Здатність деяких видів бацил синтезувати антибіотичні екзометаболіти обумовлює значний інтерес до них як до потенційних агентів біологічного захисту рослин. Раніше за результатами скринінгу серед 100 штамів бацил нами був відібраний штаму *Bacillus* sp. С6 як найбільш активний антагоніст фітопатогенних мікроміцетів та бактерій [7]. Мета цієї роботи — встановити його видову належність з використанням методів поліфазного таксономічного аналізу.

Матеріали та методи. Об'єктом досліджень був штаму *Bacillus* sp. С6, відібраний нами раніше як активний антагоніст фітопатогенних бактерій та грибів. Культурально-морфологічні властивості вивчали при вирощуванні бактерій на МПА і сусло-агарі [8].

Фізіолого-біохімічні характеристики штаму вивчали відповідно до методичних рекомендацій з виділення та ідентифікації бактерій роду *Bacillus* [9, 10], керуючись диференційними характеристиками видів бацил, наведеними у визначнику Бергі [11].

При електронно-мікроскопічному дослідженні біомасу клітин суспендували в фізіологічному розчині та адсорбували на мідних сіточках з формваровою підложкою протягом 15–20 хв. Клітини контрастували 1%-ним розчином ураніацетату в етиловому спирті впродовж 30 с, промивали і висушували. Електронну мікроскопію проводили з використанням електронного просвітлювального мікроскопа JEM-1400 («JEOL», Японія) при 80 кВ.

Жирнокислотний склад клітинних ліпідів визначали методом хромато-мас-спектрометрії на

приладі Agilent 6890N/5973inert («Agilent Technologies», США), колонка капілярна HP-5MS (30 м × 0,25 мм × 0,25 мкм) («J&W Scientific», США). Розділення проводили за градієнтом температури 4 °С/хв від 150 до 250 °С, газ-носії – гелій, швидкість потоку колонки 1 мл/хв. Ідентифікацію метилових ефірів жирних кислот здійснювали з використанням бібліотек мас-спектрів NIST02 і стандартної суміші метилових ефірів жирних кислот бактерій (4708-U Supelco, США).

Для отримання метилових ефірів жирних кислот до промитої фізіологічним розчином добової культури додавали 2%-ний розчин хлористого ацетилю в метанолі і витримували 2 год при 80 °С. Метиллові ефіри тричі екстрагували гептаном і упарювали до 200 мкл.

Ампліфікацію гена 16S рРНК для визначення та аналізу нуклеотидної послідовності проводили з праймерами 27f та 1492g згідно зі стандартним протоколом [12]. Очищений ПЛР-продукт секвенували у двох напрямках на приладі «Genetic Analyzer 3130» з використанням набору реактивів «BigDye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit». Первинний порівняльний аналіз секвенованої послідовності проводили за допомогою програми NCBI Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Філогенетичний аналіз і порівняння нуклеотидних послідовностей фрагмента гена 16S рРНК представників різних видів роду *Bacillus* здійснювали, як описано в роботі [13]. Дендрограму філогенетичних зв'язків будували за допомогою методу найближчого зв'язування (Neighbor Joining) та двопараметричної моделі Кімури по 100 репліках бутстреп-аналізу з використанням програми MEGA 5 [14]. Послідовності гена 16S рРНК типових культур бактерій роду *Bacillus* взято з бази даних GenBank та веб-ресурсу www.straininfo.net.

Результати досліджень та їх обговорення. У добовій культурі штаму *Bacillus* sp. С6 представлений грампозитивними рухливими паличками довжиною 2,0–2,2 мкм і діаметром 0,7–0,9 мкм (рис. 1). Клітини в препаратах розташовувалися попарно, іноді ланцюгами. У клітинах виявлено спори еліпсоїдної форми, що мали центральне розташування. При рості протягом 24 год на сусли-агарі утворювалися матові колонії бежевого кольору діаметром близько 5 мм, неправильної форми, з опуклим профі-

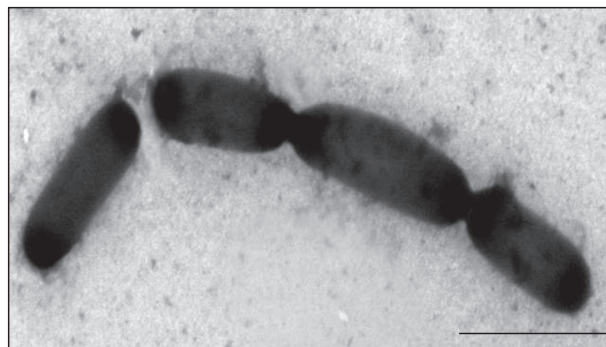


Рис. 1. Електронна мікрофотографія клітин *Bacillus* sp. С6. Масштаб: 2 мкм

лем, хвилястим краєм, однорідної структури і щільної консистенції.

Згідно з даними літератури для ідентифікації бактерій роду *Bacillus* можна використовувати понад 100 різних фенотипових ознак, однак різні штами одного виду можуть відрізнятися за окремими з них. У зв'язку з цим для спрощення фенотипової ідентифікації був розроблений ключ з урахуванням ефективності оцінки окремих параметрів, що найчастіше використовуються при ідентифікації спороутворюючих бактерій [15]. При дослідженні фізіолого-біохімічних властивостей *Bacillus* sp. С6 встановлено, що штаму належить до IV групи – облігатно аеробні бацили, що здатні до редукції нітратів (табл. 1).

При спороутворенні клітини штаму не роздувалися. Крім того, штаму здатний утилізувати цитрат, тому згідно з використаним ключем, може належати до виду *B. subtilis*. Однак 90 % штамів *B. subtilis* можуть метаболізувати цитрат, а для 80 % штамів *B. amyloliquefaciens* він недоступний [15]. Таким чином, зазначена характеристика не може слугувати чіткою диференційною ознакою між цими видами. При аналізі інших біохімічних властивостей показано, що штаму, ймовірно, належить до одного з цих видів.

Якісний і кількісний склад жирних кислот клітинних стінок бактерій є важливою таксономічною ознакою, що широко використовується при ідентифікації. Штаму *Bacillus* sp. С6 характеризується високим вмістом розгалужених (ізота антеізо-С15:0 і С17:0) жирних кислот, що складають приблизно 85 % загального жирно-

Таблиця 1. Фенотипові властивості штаму *Bacillus* sp. С6

Фізіолого-біохімічна характеристика	<i>Bacillus</i> sp. С6	Типовий штам [11]	
		<i>B. subtilis</i>	<i>B. amyloliquefaciens</i>
Ріст			
аеробний	+	+	+
анаеробний	–	–	–
Реакція Фогес-Проскауера	+	+	+
Редукція нітратів	+	+	+
Гідроліз			
крохмалю	+	+	+
казеїну	+	+	+
тирозину	–	–	–
желатину	+	+	+
Утилізація			
цитрату	+	+	+
пропіонату	–	–	–
Утворення			
індолу	–	н	н
сірководню	–	н	н
аміаку	+	н	н
Наявність			
уреази	+	н	н
лецитинази	+	+	+
каталази	+	+	+
Ріст при рН середовища			
6	+	+	+
7	+	+	+
8	+	+	–
9	+	н	–
10	–	н	–
NaCl потрібно для росту	–	–	–
Ріст при концентрації NaCl в середовищі, %			
2	+	+	+
5	+	+	+
7	+	+	н
10	+	в	в
Ріст при температурі, °С			
20	+	+	+
30	+	+	+
40	+	+	+
50	+	+	+
Кислотоутворення на середовищі з			
глюкозою	+	+	+
арабінозою	+	+	в
манітом	+	+	+
манозою	+	+	в
салцином	+	+	+
крохмалем	+	+	+
сахарозою	+	н	н
ксилозою	+	+	в

Примітка. «+» – наявність ознаки, «–» – відсутність ознаки. Для типових штамів «+» ознака зустрічається у понад 84 % штамів, «–» – менше ніж у 14 %, «в» – у 16–84 % штамів, «н» – інформація не представлена.

кислотного пулу (табл. 2). Відомо, що типовою ознакою бацил є сумарний вміст розгалужених насичених та ненасичених жирних кислот в межах 54–85 %, з перевагою в їх складі ізо- та антеізо-С15:0 кислот [16].

Таким чином, відносний вміст ізомерів жирних кислот штаму *Bacillus sp. С6* дещо відрізняється від відповідних показників типових штамів, проте якісний склад жирних кислот виявився характерним для бактерій групи *B. subtilis*. Слід також зазначити, що кількісне співвідношення різних типів жирних кислот може змінюватися у окремих штамів залежно від поживного середовища [17] або умов куль-

тивування, а також відрізнятися через штамову специфічність [18].

Порівняльний аналіз секвенованого фрагмента гена 16S рРНК штаму *Bacillus sp. С6* за допомогою програми BLAST виявив 99 % гомології з представниками кількох видів роду *Bacillus*, а саме *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. atrophaeus*, *B. velezensis*.

Іншим методичним підходом для більш коректної ідентифікації близькоспоріднених бактерій є ретельний аналіз послідовності гена 16S рРНК, а саме поліморфізму у певних сайтах: використання ендонуклеаз рестрикції [21], пошук поліморфних нуклеотидів у варіабельній

Таблиця 2. Жирнокислотний склад клітинної стінки *Bacillus sp. С6*

Жирні кислоти	Вміст жирних кислот, %							
	<i>Bacillus sp. С6</i>	1	2	3	4	5	6	7
3ОН С11:0	–	–	–	–	–	–	2,5	–
3ОН С12:0	0,9	–	–	–	–	–	–	–
i-C13:0	–	–	–	–	–	–	0,7	6,3
i-C14:0	–	1,7	1,0	1,1	–	5,3	1,2	2,3
С14:0	–	–	0,4	3,0	–	2,1	0,6	4,0
i-C15:0	13,8	21,3	40,3	32,7	6,5	38,7	47,9	44,7
ai-C15:0	34,5	38,3	28,3	29,9	68,5	45,4	26,8	2,8
С15:0	0,2	–	–	–	–	–	–	–
3ОН С14:0/2ОН i-C15:0	–	–	–	–	–	–	–	10,6
3ОН С14:0/i-C16:II	–	–	–	–	–	–	–	2,3
С16:1 w7c alcohol	–	–	–	–	–	–	1,6	–
С16:1 w11c	–	–	–	–	–	–	2,9	–
i-C16:0	6,4	5,1	2,1	1,3	–	1,5	1,3	3,2
7-C16:1	–	–	0,4	–	–	–	–	–
С16:1	0,1	–	–	–	–	–	–	–
С16:0	5,3	6,0	–	13,4	2,6	3,9	1,5	3,3
i-C17:0	18,6	10,4	13,1	7,7	22,5	–	3,3	5,7
i-C17:1 w10c	–	–	–	–	–	–	4,1	2,4
i-C17:1 w5c	–	–	–	–	–	–	–	6,5
i-C17:1	–	–	–	–	–	–	1,5	–
ai-C17:0	18,5	11,1	–	4,3	–	3,1	3,1	–
С17:0	0,3	–	6,5	–	–	–	–	–
i-C18:0	–	–	–	–	–	–	–	–
С18:0	0,7	1,6	–	–	–	–	–	–
С18:2	–	2,9	–	–	–	–	–	–
С18:2w6,9c/С18:0ante	–	–	–	–	–	–	0,4	3,9
С18:1	–	1,7	–	–	–	–	–	–
С18:1 w9c	–	–	–	–	–	–	0,8	2,1

Примітка. 1 – *B. amyloliquefaciens* CCUG 28519T (дані отримані з web-ресурсу www.ccug.se); 2 – *B. amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* DSM 7^T [19]; 3 – *B. velezensis* CR 502^T [20], 4 – *B. coagulans* CCUG 7417; 5 – *B. megaterium* CCUG 24714; 6 – *B. pumilus* CCUG 3273; 7 – *B. thuringiensis* CCUG 7429T.

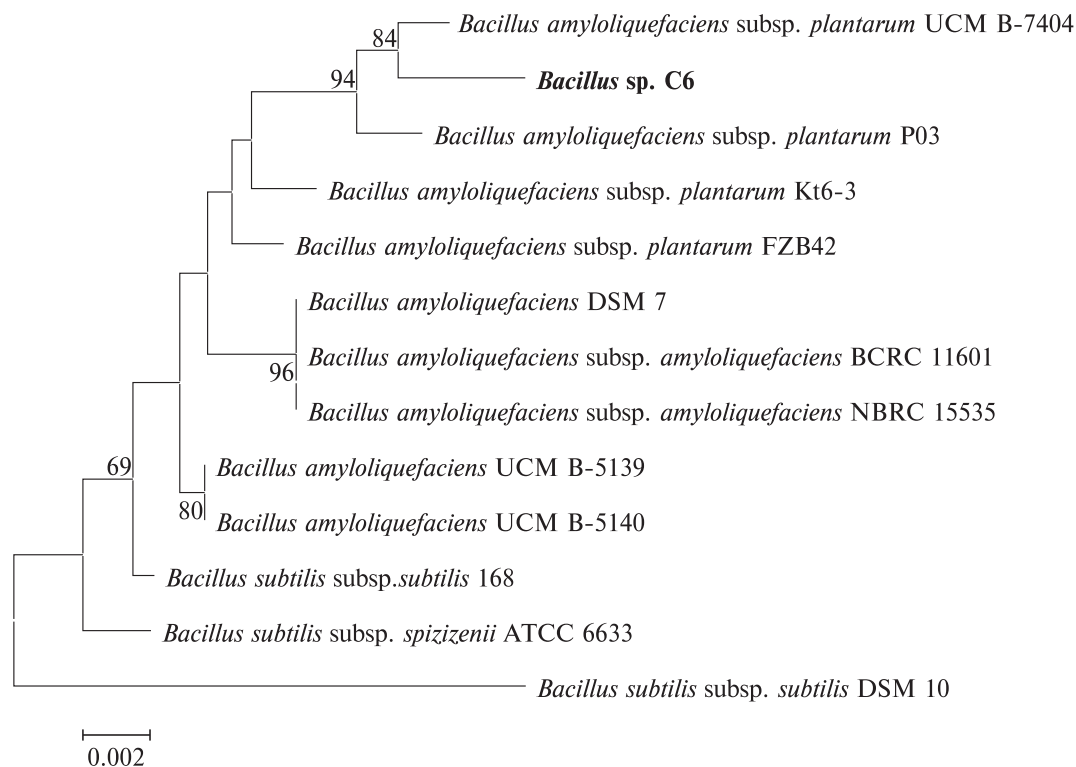


Рис. 2. Дендрограма філогенетичних зв'язків між штамом *Bacillus* sp. C6 та типовими штамми бактерій роду *Bacillus*

Таблиця 3. Профілі секвенованих поліморфних нуклеотидів гена 16S рРНК у бактерій групи *B. subtilis*

Вид	Позиція поліморфних нуклеотидів								
	180	185	202	234	271	285	465	472	483
<i>B. amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> FZB42	G	C(T)	G	G	C	G(A)	G	A	C
<i>B. amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> UCM B-5017, UCM B-5044, <i>Bacillus</i> sp. C6	G	C	G	G	C	G	G	A	C
<i>B. velezensis</i> CR-502T	G	T	G	A	C	A	G	A	C
<i>B. atrophaeus</i> DSM 7264T	C	T	A	G	C	A	G	A	C
<i>B. vallismortis</i> DSM 11031T	C	T	A	G	T	A	G	A	C
<i>B. axarquiensis</i> LMG 22476, <i>B. malacitensis</i> LMG 22477	C	T	A	G	T	A	A	G	T
<i>B. mojavensis</i> DSM 9205T	C	T	A	G	C	A	A	G	T
<i>B. subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> B-5014	C	T	A	A	T	A	A	G	T
<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> 168	G	T	A	G	T(C)	A(G)	A(G)	G	T
<i>B. subtilis</i> UCM B-5049, UCM B-5137	G	T	A	G	T	A	A	G	T

Примітка. У дужках наведено нуклеотиди, що можуть зустрічатися в різних алелях гена.

ділянці гена 16S рРНК [22–25]. Для уточнення систематичного положення досліджуваного штаму був проведений аналіз профілю поліморфних нуклеотидів, результати якого показали схожий спектр з видом *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* (табл. 3).

Окрім того, на підставі аналізу нуклеотидної послідовності фрагмента гена 16S рРНК побудовано дендрограму філогенетичних взаємовідносин між різними представниками бактерій групи *B. subtilis*. На дендрограмі досліджуваний штам увійшов в одну групу зі штамми *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* UCM В-7404 та *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* P03 (рис. 2).

Отже, за результатами аналізу нуклеотидної послідовності фрагмента гена 16S рРНК штам *Bacillus* sp. C6 ідентифіковано як *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*.

Висновки. Таким чином, за культурально-морфологічними і фізіолого-біохімічними ознаками, а також за результатами аналізу жирнокислотного складу клітинної стінки та даними секвенсу фрагмента гена 16S рРНК штам *Bacillus* sp. C6 можна віднести до підвиду *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*.

THE POLYPHASIC TAXONOMIC ANALYSIS OF THE STRAIN *BACILLUS* SP. C6 – PHYTOPATHOGENIC MICROORGANISMS ANTAGONIST

A.Yu. Grabova, I.V. Dragovoz, L.B. Zelena,
A.N. Ostapchuk, L.V. Avdeeva

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, Kyiv
E-mail: gau.imv@ukr.net

The polyphasic taxonomic analysis of the strain-antagonist of phytopathogenic bacteria and micromycetes has been carried out. It was found that the combination of culture-morphological, physiological and biochemical properties allowed attributing the strain to *Bacillus subtilis* group. It was shown that fatty acids of cell walls of the strain were represented mainly by branched derivatives of iso- and antiiso-C15:0 and C17:0 fatty acids (85 %) which was typical for the *Bacillus amyloliquefaciens* species. After molecular genetic analysis of the nucleotide sequence of 16S rRNA gene fragment and studying the profile of polymorphic nucleotides the strain was attributed to species *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*.

ПОЛИФАЗНЫЙ ТАКСОНОМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ШТАММА *BACILLUS* SP. C6 – АНТАГОНИСТА ФИТОПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

А.Ю. Грабова, И.В. Драговоз, Л.Б. Зеленая,
А.Н. Остапчук, Л.В. Авдеева

Проведен полифазный таксономический анализ штамма *Bacillus* sp. C6 – антагониста фитопатогенных бактерий и микромицетов. По совокупности культурально-морфологических и физиолого-биохимических свойств штамм относится к группе *Bacillus subtilis*. Жирные кислоты клеточных стенок штамма представлены в основном разветвленными производными изо- и антиизо-C15:0 и C17:0 жирных кислот (более 85 %), что характерно для вида *Bacillus amyloliquefaciens*. При проведении молекулярно-генетического анализа нуклеотидной последовательности фрагмента гена 16S рРНК, а также при изучении профиля полиморфных нуклеотидов штамм отнесен к подвиду *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Prakash, O., Verma, M., Sharma, P., Kumar, M., Kumari, K., Singh, A., Kumari, H., Jit, S., Gupta, S.K., Khanna, M., and Lal, R., Polyphasic approach of bacterial classification — an overview of recent advances, *Indian J. Microbiol.*, 2007, vol. 47, no. 2, pp. 98–108.
2. Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., de Vos, P., Kersters, K., and Swings, J., Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics, *Microbiol. Rev.*, 1996, vol. 60, no. 2, pp. 407–438.
3. Gevers, D., Cohan, F.M., Lawrence, J.G., Spratt, B.G., Coenye, T., Feil, E.J., Stackebrandt, E., de Peer, Y.V., Vandamme, P., Thompson, F.L., and Swings, J., Re-evaluating prokaryotic species, *Nature Rev. Microbiol.*, 2005, vol. 3, no. 9, pp. 733–739.
4. Bernardet, J.F., Vancanneyt, M., Matte-Tailliez, O., Grisez, L., Tailliez, P., Bizet, C., Nowakowski, M., Kerrouault, B., and Swings, J., Polyphasic study of *Chryseobacterium* strains isolated from diseased aquatic animals, *Syst. Appl. Microbiol.*, 2005, vol. 28, no. 7, pp. 640–660.
5. Dahllöf, I., Molecular community analysis of microbial diversity, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2002, vol. 13, no. 3, pp. 213–217.
6. Berkeley, R., Heyndrickx, M., Logan, N., and de Vos, P., *Applications and systematics of Bacillus and relative*, Wiley-Blackwell, 2002, 336 p.
7. Grabova, A.Yu, Dragovoz, I.V., Zelena, L.B., Kruchkova, L.A., Pasichnik, L.A., and Avdeeva, L.V., Screening *Bacillus* strains's screening — antagonists of pathogenic microorganisms. *Materials of XI Ukr. biohim. Congr.*, Kyiv, 2014, p. 180.

8. Netrusov, A.I., Egorova, M.A., and Zakharchuk, L.M., Practice on microbiology, Moscow, 2005, 608 p.
9. Smirnov, V.V., Reznick, S.G., and Sorokulova, I.B., Guidelines for isolation and identification of bacteria *Bacillus subtilis*-mesentericus group from humans and animals, Kyiv, 1980, 26 p.
10. Reva, O.N., Smirnov, V.V., Pettersson, B., and Priest, F.G., *Bacillus endophyticus* sp. nov., isolated from the inner tissues of cotton plants (*Gossypium* sp.), *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2002, vol. 52, pp. 101–107.
11. Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.-H., and Whitman, W.B., eds, *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 3, The Firmicutes, New York, Springer, 2009, 1450 p.
12. Lane, D.G., 16S/23S rRNA sequencing, *Nucleic acids techniques in bacterial systematics*, eds E., Stackebrandt, and M., Goodfellow, Chichester, UK, John Wiley, 1991, pp. 115–175
13. Safronova, L.A., Zelena, L.B., Klochko, V.V., and Reva, O.N., Does the applicability of *Bacillus* strains in probiotics rely upon their taxonomy, *Can. J. Microbiol.*, 2012, vol. 58, no. 2, pp. 212–219.
14. Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S., MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods, *Mol. Biol. Evol.*, 2011, vol. 28, no. 10, pp. 2731–2739.
15. Reva, O.N., Sorokulova, I.B., and Smirnov, V.V., Simplified technique for identification of the aerobic spore-forming bacteria by phenotype, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2001, vol. 51, pp. 1361–1371.
16. Kaneda, T., Fatty acids of the genus *Bacillus*: an example of branched-chain preferences, *Bacteriol. Rev.*, 1977, vol. 41, no. 2, pp. 391–418.
17. Ehrhardt, C.J., Chu, V., Brown, T.C., Simmons, T.L., Swan, B.K., Bannan, J., and Robertson, J.M., Use of fatty acid methyl ester profiles for discrimination of *Bacillus cereus* T-strain spores grown on different media, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2010, vol. 76, no. 6, pp. 1902–1912.
18. Ibragimova, M.Y., Salafutdinov, I.I., Sahin, F., and Zhdanov, R.I., Biomarkers of *Bacillus subtilis* total lipids FAME profile under various temperatures and growth phases, *Dokl. Biochem. Biophys.*, 2012, vol. 443, no. 5, pp. 109–112.
19. Borriss, R., Chen, X.-H., Rueckert, C., Blom, J., Becker, A., Baumgarth, B., Fan, B., Pukall, R., Schumann, P., Sproer, C., Junge, H., Vater, J., Puhler, A., and Klenk, H.-P., Relationship of *Bacillus amyloliquefaciens* clades associated with strains DSM7^T and FZB42^T: a proposal for *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* subsp. nov. and *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* subsp. nov. based on their discriminating complete genome sequences comparisons, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2011, vol. 61, pp. 1786–1801.
20. Ruiz-Garcia, C., Bejar, V., Martínez-Checa, F., Llamas, I., and Quesada, E., *Bacillus velezensis* sp. nov., a surfactant-producing bacterium isolated from the river Velez in Malaga, southern Spain, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2005, vol. 55, pp. 191–195.
21. Jeyaram, K., Romi, W., Singh, T.A., Adewumi, G.A., Basanti, K., and Oguntoyinbo, F.A., Distinct differentiation of closely related species of *Bacillus subtilis* group with industrial importance, *J. Microbiol. Methods*, 2011, vol. 87, no. 2, pp. 161–164.
22. 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, no. 1, pp. 1–8.
23. Idriss, E.E., Makarewicz, O., Farouk, A., Rosner, K., Greiner, R., Bochow, H., Richter, T., and Borriss, R., Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant-growth-promoting effect, *Microbiology*, 2002, vol. 148, pp. 2097–2109.
24. Reva, O.N., Dixelius, C., Meijer, J., and Priest, F.G., Taxonomic characterization and plant colonizing abilities of some bacteria related to *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis*, *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2004, vol. 48, no. 2, pp. 249–259.
25. Safronova, L.A., Zelena, L.B., Klochko, V.V., Avdeeva, L.V., Reva, O.N., and Pidgorskyi, V.S., Geno- and phenotypic characteristic of *Bacillus* strains – components of endospore, *Microbiol. J.*, 2012, vol. 74, no. 5, pp. 55–65.

Надійшла 20.05.15