

ТАКСОНОМІЧНИЙ АНАЛІЗ ШТАМУ *BACILLUS* SP. 20F ФОСФАТМОБІЛІЗАТОРА З АНТАГОНІСТИЧНИМИ ВЛАСТИВОСТЯМИ

Ю.В. КОРЖ, Л.Б. ЗЕЛЕНА, І.В. ДРАГОВОЗ, Л.В. АВДЄЄВА

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ 03143, Україна

E-mail: Jullinka35@meta.ua

В роботі встановлено систематичне положення штаму *Bacillus* sp. 20F – антагоніста фітопатогенних бактерій і мікроміцетів з вираженими фосфатмобілізувальними властивостями. Показано, що за сукупністю культурально-морфологічних і фізіолого-біохімічних властивостей штаму належить до групи *Bacillus subtilis*. Жирні кислоти клітинних стінок штаму представлені переважно розгалуженими похідними ізо- та антеізо- C15:0 і C17:0 жирними кислотами (приблизно 82 %), що характерно для виду *Bacillus amyloliquefaciens*. За результатами аналізу нуклеотидної послідовності гена 16S рРНК, а також при вивченні профілю поліморфних нуклеотидів штаму віднесено до виду *Bacillus velezensis*.

Ключові слова: *Bacillus* sp. 20F, культурально-морфологічні ознаки, фізіолого-біохімічні властивості, жирнокислотний склад, молекулярно-генетичний аналіз, ідентифікація, систематичне положення.

Вступ. Деякі ризосферні бактерії роду *Bacillus* (PGPR-бактерії), що стимулюють ріст рослин, позитивно впливають на нагромадження їх біомаси і, відповідно, на продуктивність сільськогосподарських культур (Beneduzi et al, 2012). Такі результати досягаються завдяки синтезу бактеріями роду *Bacillus* антимікробних вторинних метаболітів (антибіотиків), ефективній конкуренції за екологічну нішу і поживні речовини, а також здатності до стимуляції системної стійкості рослин завдяки синтезу певних екзометаболітів (Ongena et al, 2008). Тому бактерії роду *Bacillus* вважаються перспективними агентами біоконтролю хвороб рослин, і можуть використовуватись у складі біопрепаратів для сільськогосподарського рослинництва. Необхідною умовою для такого використання бактерій роду *Bacillus* є визначення систематичного положення досліджуваних штамів.

Для цього використовують різні методи досліджень. Однак ідентифікація бактерій роду *Bacillus* до виду ускладнюється через подібність деяких видів цих мікроорганізмів за морфологічними, біохімічними та генетичними характеристиками.

З розвитком молекулярно-генетичних методів досліджень, систематика бацил істотно змінилася. Так, з 2011 року штами *B. amyloliquefaciens* були розділені між підвидами *B. amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* і *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* на основі аналізу повного геному (Borriss et al, 2011). Окрім того, порівняльний генетичний аналіз *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* і *B. methylotrophicus* засвідчив, що їх геноми дуже схожі (95 %), з незначними відмінностями в певних послідовностях генів (Dunlap et al, 2015). Тому, вид *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* був віднесений до *B. methylotrophicus* (Dunlap et al, 2015), а *B. methylotrophicus* – до виду *B. velezensis* через високу фенотипову і генотипову ідентичність таксонів (Dunlap et al, 2016). Тому для визначення систематичного положення досліджуваних штамів, зокрема бактерій роду *Bacillus*, необхідним є використання комплексу методів таксономічного аналізу, до складу якого входять визначення культуральних, морфологічних, фізіолого-біохімічних властивостей, визначення складу жирних кислот клітинної стінки бактерій, а також молекулярно-генетичні методи, зокрема сиквенс гена 16S рРНК.

Раніше нами за результатами скринінгу, серед 50 штамів ризосферних бацил був відібраний штаму *Bacillus* sp. 20F, як ефективний антагоніст фітопатогенних мікроміцетів та бактерій з вираженими фосфатмобілізувальними властивостями. Тому метою нашої роботи було встановлення його видової на-

лежності з використанням різних методів таксономічного аналізу.

Матеріали та методи. Об'єктом досліджень був штам *Bacillus* sp. 20F, відібраний нами, як продуцент позаклітинної фітази та антагоніст фітопатогенних бактерій і грибів.

Культурально-морфологічні властивості вивчали при вирощуванні бактерій на агаризованому середовищі Nutrient Broth (Netrusov et al, 2005).

Фізіолого-біохімічні характеристики штаму вивчали відповідно до методичних рекомендацій з виділення та ідентифікації бактерій роду *Bacillus* (Reva et al, 2001), керуючись диференційованими характеристиками видів бацил, наведеними у визначнику Бергі (de Vos et al, 2009), а також за допомогою тест-наборів API 20E та MICROLATEST ENTERO-Rapid 24.

Для електронно-мікроскопічного дослідження біомасу суспендували в фізіологічному розчині та адсорбували на мідних сіточках з формваровою підложкою, скріпленою карбоном, протягом 15–20 хв. Клітини контрастували 2%-ним розчином фосфорно-вольфрамової кислоти 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 вивчали методом хромато-мас-спектрометрії на приладі Agilent 6890N/5973inert («Agilent Technologies», США), колонка капілярна HP-5MS (30м × 0,25 мм × 0,25 мкм) (J and W Scientific, США). Розділення проводили за градієнтом температури 4 °С/хв від 150 до 250 °С, газ-носії – гелій, швидкість потоку – 1 мл/хв. Ідентифікацію метилових ефірів жирних кислот проводили з використанням бібліотек мас-спектра 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 при 80 °С впродовж 2 год. Метилові ефіри тричі екстрагували гептаном і упарювали до 200 мкл.

Ампліфікацію гена 16S рРНК для визначення та аналізу нуклеотидної послідовності про-

водили з праймерами 27f і 1492r, згідно стандартного протоколу (Lane, 1991). Очищений ПЛР-продукт сиквенували у двох напрямках на приладі «Genetic Analyzer 3130» з використанням набору реактивів «BigDye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit». Первинний порівняльний аналіз сиквенованої 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 Сафронової із співавторами (Safronova et al, 2011). Дендрограму філогенетичних зв'язків будували за допомогою методу найближчого зв'язування (Neighbor Joining) з використанням двопараметричної моделі Кімури по 100 реплікам бутстреп-аналізу з використанням програми MEGA 5 (Tamura et al, 2012). Послідовності гена 16S рРНК типових культур бактерій роду *Bacillus* були взяті з бази даних GenBank та web-ресурсу www.straininfo.net.

Результати досліджень та їх обговорення. Клітини *Bacillus* sp. 20F являють собою грам-позитивні палички довжиною 2,0–2,5 мкм і діаметром 0,6–0,9 мкм, розташовані як поодинокі, так і парами, а іноді і короткими ланцюжками. Ендоспори мають циліндричну форму, термінальне положення в не набряклих спорангіях. Вони не містять параспоральних кристалів і не накопичують полі-β-гідроксімаляну кислоту. Рухливі, джгутики розташовані перитрихально (рис 1). У рідкому середовищі Nutrient Broth штам *Bacillus* sp. 20F утворює тонку плівку. На агаризованому середовищі Nutrient Broth утворює матові колонії бежевого кольору діаметром близько 5 мм, неправильної форми, з опуклим профілем, хвилястим краєм, однорідної структури і щільної консистенції. Штам *Bacillus* sp. 20F здатний рости при концентрації NaCl до 12 %, в діапазоні температур 20–50 °С і при значеннях рН 6–10. Досліджуваний штам є хеморганотрофом, синтезує каталазу і оксидазу. Його метаболізм дихальний, з киснем в якості кінцевого акцептора електронів. Він не росте в анаеробних умовах.

Культура не окислює глюкозу, манніт, інозит, сорбіт, рамному, сахарозу, мелібіозу, аміг-

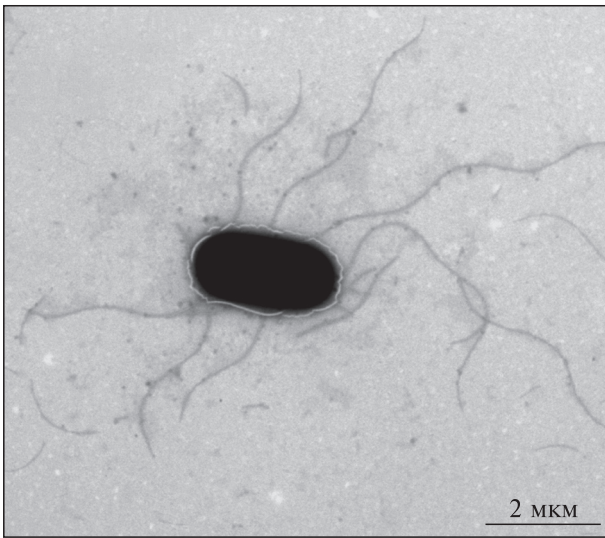


Рис. 1. Електронна мікроскопія клітин *Bacillus* sp. 20F

далін та арабінозу (за результатами тестів АРІ 20Е). Реакція Фогес-Проскауера, аргінін-гидролаза, триптофандеаміназа, α -галактозидаза та β -ксилозидаза позитивні, гідролізує ескулін, крохмаль, казеїн, желатин, утилізує цитрат. Рoste на середовищі без дріжджового екстракту, не гідролізує тирозин, не продукує індол. Реакції на лізіндекарбоксілазу, орнітин-декарбоксілазу, уреазу, фенілаланіндезаміназу, β -галактозидазу та β -глюкуронідазу – негативні.

Основні біохімічні властивості штаму *Bacillus* sp. 20F та типових штамів *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* та *B. velezensis* CR-502^T наведені у табл. 1. Для ідентифікації бактерій роду *Bacillus* можна використовувати понад 100 різних фенотипових ознак, в той час як різні штами одного виду можуть відрізнятися за окремими з них (Ruiz-García et al, 2005). Для спрощення фенотипової ідентифікації був розроблений ключ, що дозволяє ідентифікувати види на основі декількох простих тестів з врахуванням їх дискримінаційної ефективності (Reva et al, 2001). Зокрема, при дослідженні фізіолого-біохімічних властивостей *Bacillus* sp. 20F показано, що штам належить до IV групи – облигатно аеробні бацили, що гідролізують крохмаль. Центральним видом цієї групи вважається *B. subtilis*. Проте, за наведеними вище ознаками ідентифікувати досліджуваний штам з точністю до 95,0 % нам не вдалося. За спектром властивостей, найбільш близьким видом до до-

сліджуваного штаму *Bacillus* sp. 20F з 78,8 % подібності був вид *B. subtilis*.

Заслугує на увагу факт відсутності кислотоутворення на середовищі з цурками. Проте, як зазначено у (De Vos et al, 2009), ознака вважається позитивною, якщо зустрічається у 84 % досліджених штамів одного виду, тому досить складно на основі лише фенотипових характеристик ідентифікувати досліджуваний штам.

Іншою важливою таксономічною ознакою, що широко використовується при ідентифікації бактерій вважається якісний і кількісний склад жирних кислот їх клітинних стінок. Склад жирних кислот бактеріальних клітин змінюється в залежності від виду і впродовж багатьох років використовується як біохімічний маркер у таксономії (Guinebretiere et al, 2013; de Carvalho et al, 2018). Відомо, що деякі жирні кислоти є загальними на рівні роду, тоді як інші специфічні для видів з певних екологічних ніш (de Carvalho et al, 2018). Крім того, відомо, що кількісне співвідношення різних типів жирних кислот може змінюватися у окремих штамів залежно від умов культивування бактерій (Diomandé et al, 2015), зокрема складу поживного середовища (Ehrhardt et al, 2010; de Sarrau et al, 2012), температури (Chazarreta Cifré et al, 2013), рН (Petrackova et al, 2010; Shobharani et al, 2014), що в свою чергу, може призвести до складнощів при ідентифікації. В даній роботі ми використовували однакові умови культивування (стандартизоване середовище постійного складу, температура, рН) для визначення культуральних, морфологічних, фізіолого-біохімічних властивостей, визначення складу жирних кислот клітинної стінки бактерій, а також для молекулярно-генетичних методів досліджень.

У табл. 2 наведено жирнокислотний склад клітинної стінки досліджуваного штаму у порівнянні з типовими штамми споріднених видів, що представлені у базі даних web-ресурсу <https://www.ccug.se>. Показано, що штам *Bacillus* sp. 20F характеризується високим вмістом розгалужених (ізо- та антеізо- С15:0 і С17:0) жирних кислот, що складають приблизно 82 % від загального жирнокислотного пулу. Відомо, що характерною ознакою бактерій роду *Bacillus* є наявність жирних кислот з розгалуженим ланцюгом (Kaneda, 1991) і перевагою в їх

складі ізо- та антеізо розгалуженого ланцюга, що містить 12–17 атомів вуглецю (Berkeley et al, 2002). Слід відзначити, що ізо-C_{15:0}, антеізо-C_{15:0}, ізо-C_{16:0}, ізо-C_{17:0} та антеізо-C_{17:0}

Таблиця 1. Фенотипові властивості штаму *Bacillus sp.* 20F

Фізіолого-біохімічна характеристика	<i>Bacillus sp.</i> 20F	Типовий штам		
		<i>B. velezensis</i> CR-502 ^T (Ruiz-Garcia et al, 2005)	<i>B. subtilis</i> (De Vos et al, 2009)	<i>B. amyloliquefaciens</i> (De Vos et al, 2009)
Ріст				
аеробний	+	+	+	+
анаеробний	–	–	–	–
Реакція Фогес-Проскауера	+	+	+	+
Редукція нітратів	+	+	+	+
Гідроліз				
крохмалю	+	+	+	+
казеїну	+	+	+	+
тирозину	–	–	–	–
желатину	+	+	+	+
Утилізація цитрату	+	–	+	–
Утворення				
індолу	–	–	н	н
сірководню	–	+	н	н
Наявність				
уреази	+	+	н	н
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, °C				
20	+	+	+	+
30	+	+	+	+
40	+	+	+	+
50	+	–	+	+
Кислотоутворення на середовищі з				
глюкозою	–	+	+	+
арабінозою	–	+	+	в
манітом	–	+	+	+
манозою	–	+	+	в
саліцином	–	+	+	+
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.

Таблиця 2. Жирнокислотний склад клітинної стінки *Bacillus* sp. 20F

Жирні кислоти	Вміст жирних кислот, %							
	<i>Bacillus</i> sp. 20F	1	2	3	4	5	6	7
i-C13:0	–	–	–	–	–	–	–	6,4
i-C14:0	1,2	1,7	1,0	1,6	–	10,8	0,9	3,3
C14:0	1,0	–	–	1,6	–	2,2	–	2,7
i-C15:0	26,5	21,3	18,7	41,7	6,5	37,9	31,3	37,2
ai-C15:0	27,8	38,3	31,1	30,9	68,5	37,0	42,3	2,8
C15:0	0,3	–	–	–	–	–	–	–
3 OH C14:0/i-C16:1I	–	–	–	–	–	–	–	2,4
C16:1 w7c/2 OH i-C15:0	–	–	–	–	–	–	–	10,0
C16:1 w7c alcohol	–	–	–	–	–	1,9	1,3	–
C16:1 w11c	–	–	–	–	–	6,5	–	–
i-C16:0	3,9	5,1	3,9	1,6	–	–	2,4	5,0
C16:0	11,4	6,0	5,2	6,5	2,6	2,6	1,9	4,1
i-C17:0	16,2	10,4	15,8	8,0	22,5	–	4,6	8,5
i-C17:1 w10c	–	–	–	–	–	–	2,6	3,0
i-C17:1 w5c	–	–	–	–	–	–	–	5,8
i-C17:1	–	–	–	–	–	–	2,4	–
ai-C17:1A	–	–	–	–	–	–	–	0,8
ai-C17:0	11,4	11,1	13,2	3,9	–	1,1	9,0	0,9
C18:0	0,4	1,6	1,3	–	–	–	–	1,2
C18:2	–	–	2,9	–	–	–	–	–
C18:2w6,9c/C18:0ante	–	2,9	2,8	3,4	–	–	–	3,4
C18:1 w9c	–	1,7	1,1	–	–	–	–	2,5

Примітка. (дані отримані з web-ресурсу <https://www.ccug.se>): 1 – *B. amyloliquefaciens* CCUG 28519T, 2 – *B. subtilis* CCUG 163 B, 3 – *B. velezensis* CCUG 50740T, 4 – *B. coagulans* CCUG 7417T, 5 – *B. megaterium* CCUG 1817T, 6 – *B. pumilus* CCUG 26015T, 7 – *B. cereus* CCUG 7414T.

Таблиця 3. Профілі сиквенованих 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>Bacillus</i> sp. 20F	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	C	T	A	G	T	A	A	G	T
<i>B. malacitensis</i> LMG 22477									
<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	A	G	T
<i>B. subtilis</i> UCM B-5049, UCM B-5137	G	T	A	G	T	(G) A	(G) A	G	T

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

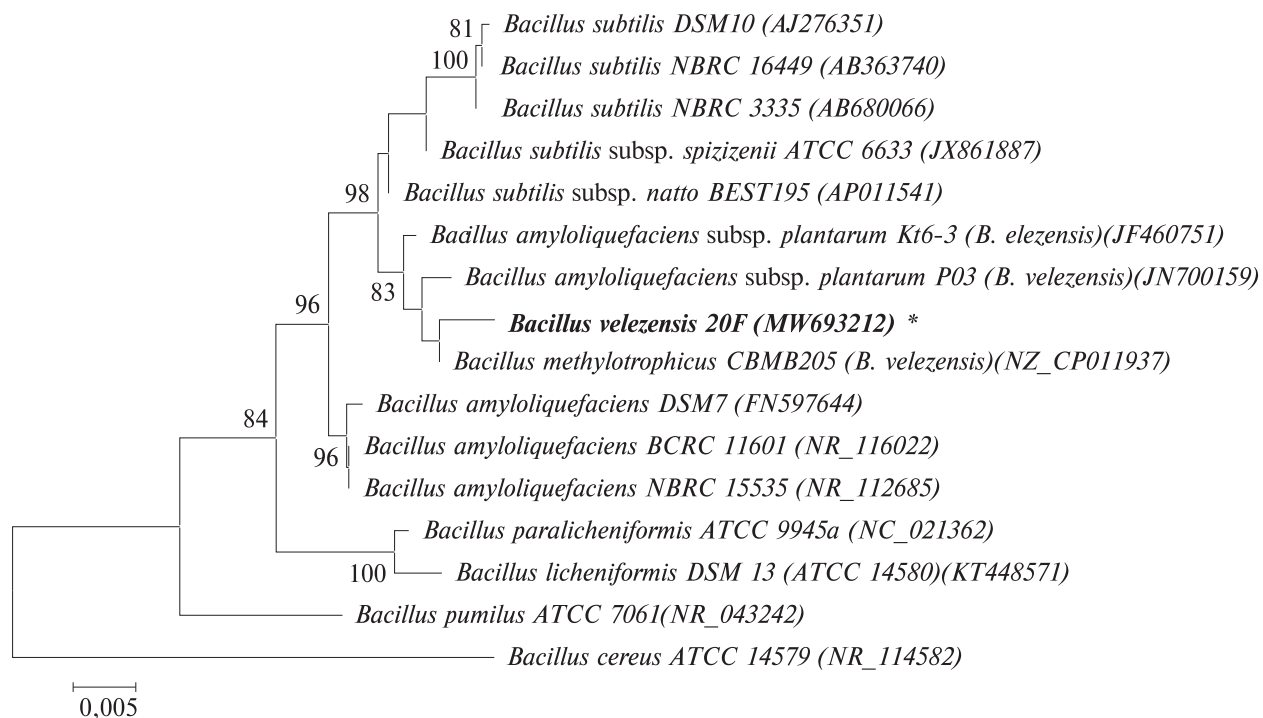


Рис. 2. Дендрограма філогенетичних зв'язків між штамом *Bacillus* sp. 20F та типовими штамми бактерій роду *Bacillus*

відносяться до основних жирних кислот, що зазвичай виявляються у видів *Bacillus* (Song et al, 2000). Як видно з табл. 2, співвідношення вмісту ізомерів жирних кислот штаму *Bacillus* sp. 20F дещо відрізняється від відповідних показників типових штамів, проте якісний склад жирних кислот виявився характерним для бактерій групи *B. amyloliquefaciens*.

Існує думка, що термотип штаму (психрофільний, мезофільний і термофільний) можна визначити за співвідношенням ai-15:0/i-15:0 (Diomandé et al, 2015). Так у роботі (Suutari et al, 1994) було показано, що у термофільних бацил присутній більш високий вміст ізо-розгалужених і менший антеізо-розгалужених жирних кислот з більш довгим ланцюгом, ніж у мезофільних штамів. У досліджуваного штаму *Bacillus* sp. 20F сумарна кількість ізо-розгалужених жирних кислот складає 47,8 %, а антеізо-розгалужених жирних кислот – 38,9 %. Враховуючи отримані дані, а також той факт, що штам *Bacillus* sp. 20F росте за 50 °C (табл. 1), можна стверджувати, що він належить до термофільних бацил.

Для ідентифікації бактерій використовують також різні молекулярно-генетичні підходи, серед яких сиквенування генів домашнього господарства (housekeeping genes), рестрикційний аналіз гена 16S рРНК та ін. (Su et al, 2012; Ngalimat et al, 2020). Найбільш точну та повну інформацію щодо визначення видової, а іноді й штамової, приналежності бактерії отримують за допомогою сиквенування повних геномів мікроорганізмів або ж декількох генів домашнього господарства (MLSA – мультилокусне сиквенування, multilocus sequence analysis). Загальноновизнаною методикою, що застосовується для ідентифікації бактерій, вважається визначення нуклеотидної послідовності гена 16S рРНК та порівняння отриманого сиквенсу з відомими послідовностями цього гена у базі даних GenBank. Поєднання результатів сиквенування 16S рРНК і результатів інших аналізів (напр., морфолого-культурального, цитологічного, біохімічного) дозволяє встановити вид досліджуваного мікроорганізму. Складність встановлення видової приналежності бактерій, що належать до групи *Bacillus subtilis*, полягає у ви-

сокому відсотку (>98,7 %) подібності послідовності гена 16S рРНК між видами цієї групи. Тому для більш коректної ідентифікації бактерій деяких груп роду *Bacillus* було запропоновано використовувати також аналіз поліморфних нуклеотидів, розташованих у певних сайтах варіабельної ділянки гена (Fernández-No et al, 2015; Nakovirta et al, 2016).

Порівняльний аналіз сиквенованого фрагмента гена 16S рРНК штаму *Bacillus* sp. 20F із задепонованими послідовностями у базі даних ГенБанк за допомогою програми BLAST виявив 99–100 % схожості з представниками кількох видів групи *B. subtilis*. Детальний аналіз варіабельної ділянки гена та встановлення поліморфних нуклеотидів у сайтах 180, 185, 202, 234, 271, 285, 465, 472, 483 був проведений для уточнення видової приналежності досліджуваного штаму. Результати цього аналізу та порівняння з іншими видами роду *Bacillus* представлені у табл. 3. Як видно з таблиці, за спектром поліморфних нуклеотидів штам 20F можна віднести до виду *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*. Однак, враховуючи результати філогенетичних досліджень та суперечливість встановлення таксономічного положення видів *B. velezensis*, *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*, *B. methylotrophicus* та *B. oryzicola*, більш коректно вважати *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* гетеротиповим синонімом виду *B. velezensis* (Dunlap et al, 2016)

З метою встановлення філогенетичних взаємовідносин між досліджуваним штамом та іншими видами групи *B. subtilis* на основі нуклеотидних послідовностей гена 16S рРНК була побудована дендрограма, представлена на рис. 2. Штам 20F на дендрограмі входить до групи штамів виду *B. velezensis*, яка, за даними бутстреп-аналізу, достовірно відокремлена від групи штамів виду *B. subtilis* та групи *B. amyloliquefaciens*. Отримані результати також підтверджують приналежність штаму 20F до виду *B. velezensis*.

Висновки. Таким чином, за культурально-морфологічними і фізіолого-біохімічними ознаками, а також за результатами аналізу жирнокислотного складу клітинної стінки та даними сиквенсу фрагмента гена 16S рРНК штам *Bacillus* sp. 20F можна віднести до виду *B. velezensis*.

Автори щиро вдячні М.А. Хархоті (ІМВ НАНУ) за допомогу у проведенні прободготовки до хро-

мато-мас-спектрометричних досліджень та М.С. Харчуку (ІМВ НАНУ) за допомогу у проведенні прободготовки до електронно-мікроскопічних досліджень. Хромато-мас-спектрометричні та електронно-мікроскопічні дослідження були виконані з використанням обладнання Центру колективного користування при Інституті мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАНУ.

Дотримання етичних стандартів. Ця робота виконана з дотриманням етичних вимог кожним із авторів та не передбачає досліджень, у які залучено тварин або людей.

Конфлікт інтересів. Автори задекларували відсутність конфлікту інтересів і фінансових зобов'язань.

Фінансування. Це дослідження не отримувало будь-якого конкретного гранту від фінансуючих установ в державному, комерційному або некомерційному секторах.

TAXONOMIC ANALYSIS OF THE STRAIN *BACILLUS* SP. 20F, A PHOSPHATE MOBILIZER WITH ANTAGONISTIC PROPERTIES

Yu. V. Korzh, L. B. Zelena, I. V. Dragovoz, L. V. Avdeyeva

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, the National Academy of Sciences of Ukraine, 154, Acad. Zabolotnoho Str., Kyiv, 03143, Ukraine
E-mail: Jullinka35@meta.ua

The systematic position of the strain *Bacillus* sp. 20F was found to be an antagonist of phytopathogenic bacteria and micromycetes with pronounced phosphate-mobilizing properties. It was shown that the set of cultural-morphological and physiological-biochemical properties of the strain belongs to the group *Bacillus subtilis*. The fatty acids of the cell wall of the strain are mainly branched derivatives of iso- and anteiso-C15:0 and C17:0 fatty acids (approximately 82 %), which is characteristic of the species *Bacillus amyloliquefaciens*. According to the analysis of the nucleotide sequence of the 16S rRNA gene and the study of the profile of polymorphic nucleotides, the strain is classified as *Bacillus velezensis*.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Berkeley R, Heyndrickx M, Logan N et al. (2002) Applications and systematics of *Bacillus* and relatives. Oxford: Blackwell Science Ltd
- Beneduzi A, Ambrosini A, Passaglia LMP. (2012) Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. Genet Mol Biol. doi: 10.1590/S1415-47572012000600020
- Borriss R, Chen XH, Rueckert C et al. (2011) Relationship of *Bacillus amyloliquefaciens* clades associ-

- ated with strains DSM7T and FZB42: a proposal for *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* subsp. nov. and *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* subsp. nov. based on their discriminating complete genome sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* 61:1786–1801
- Chazarreta Cifré L, Alemany M, de Mendoza D et al. (2013) Exploring the biosynthesis of unsaturated fatty acids in *Bacillus cereus* ATCC 14579 and functional characterization of novel acyl-lipid desaturases. *Appl Environ Microbiol*. doi: 10.1128/AEM.01761-13
- de Carvalho CCCR, Caramujo MJ. (2018) The Various Roles of Fatty Acids. *Molecules*. doi: 10.3390/molecules23102583
- de Sarrau B, Clavel T, Zwickel N et al. (2013) Unsaturated fatty acids from food and in the growth medium improve growth of *Bacillus cereus* under cold and anaerobic conditions. *Food Microbiol*. doi: 10.1016/j.fm.2013.04.008
- de Vos P, Garrity GM, Jones D et al. (2009) The Firmicutes. *Bergey's manual of systematic bacteriology* 3 (2nd ed.). Springer, New York, 1450 p
- Diomandé SE, Nguyen-The C, Guinebretière MH. (2015) Role of fatty acids in *Bacillus* environmental adaptation. *J Front Microbiol*. doi: 10.3389/fmicb.2015.00813
- Dunlap CA, Kim SJ, Kwon SW et al. (2015) Phylogenomic analysis shows that *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* is a later heterotypic synonym of *Bacillus methylotrophicus*. *Int J Syst Evol Microbiol*. doi: 10.1099/ijms.0.000226
- Dunlap CA, Kim SJ, Kwon SW et al. (2016) *Bacillus velezensis* is not a later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens*; *Bacillus methylotrophicus*, *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* and '*Bacillus oryzicola*' are later heterotypic synonyms of *Bacillus velezensis* based on phylogenomics. *Int J Syst Evol Microbiol*. doi: 10.1099/ijsem.0.000858
- Ehrhardt CJ, Chu V, Brown T et al. (2010) Use of fatty acid methyl ester profiles for discrimination of *Bacillus cereus* T-strain spores grown on different media. *Appl Environ Microbiol*. doi: 10.1128/AEM.02443-09
- Fernández-No IC, Böhme K, Caamaco-Antelo S et al. (2015) Identification of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the 16S rRNA gene of foodborne *Bacillus* spp. *Food Microbiol*. doi: 10.1016/j.fm.2014.08.010
- Hakovirta JR, Prezioso S, Hodge D et al. (2016). Identification and analysis of informative single nucleotide polymorphisms in 16S rRNA gene sequences of the *Bacillus cereus* group. *J Clin Microbiol*. doi: 10.1128/JCM.01267-16
- Guinebretiere M, Auger S, Galleron N et al. (2013). *Bacillus cytotoxicus* sp. nov. is a new thermotolerant species of the *Bacillus cereus* group occasionally associated with food poisoning. *Int J Syst Evol Microbiol*. doi: 10.1099/ijms.0.030627-0
- Kaneda T. (1991) Iso- and anteiso-fatty acids in bacteria: Biosynthesis, function and taxonomic significance. *Microbiol Rev*. 55:288–302
- Lane DG. (1991) Nucleic acids techniques in bacterial systematic In: Stackebrandt E, Goodfellow M (ed) John Wiley, Chichester, United Kingdom, 115–175 p.
- Netrusov AI, Egorova MA, Zakharchuk LM. (2005) Practice on microbiology. Academia, Moscow, 608 p
- Ngalimat MS, Sabri S. (2020) Taxonomic note: Speciation within the operational group *Bacillus amyloliquefaciens* based on comparative phylogenies of housekeeping genes. *Asia-Pac J Mol Biol Biotechnol* 28:19–26
- Ongena M, Jacques P. (2008) *Bacillus* lipopeptides: Versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol*. doi: 10.1016/j.tim.2007.12.009
- Petrackova D, Vecer J, Svobodova J et al. (2010) Long-term adaptation of *Bacillus subtilis* 168 to extreme pH affects chemical and physical properties of the cellular membrane. *J Membr Biol*. doi: 10.1007/s00232-010-9226-9
- Reva ON, Sorokulova IB, Smirnov VV. (2001) Simplified technique for identification of the aerobic spore-forming bacteria by phenotype. *Int J Syst Evol Microbiol*. doi: 10.1099/00207713-51-4-1361
- Ruiz-García C, Béjar V, Martínez-Checa F et al. (2005) *Bacillus velezensis* sp. nov., a surfactant-producing bacterium isolated from the river Velez in Malaga, southern Spain. *Int J Syst Evol Microbiol*. doi: 10.1099/ijms.0.63310-0
- Safronova LA, Zelena LB, Klochko VV et al. (2012) Does the applicability of *Bacillus* strains in probiotics rely upon their taxonomy. *Can J Microbiol*. doi: 10.1139/w11-113.
- Shobharani P, Halami PM. (2014) Cellular fatty acid profile and H(+)-ATPase activity to assess acid tolerance of *Bacillus* sp. for potential probiotic functional attributes. *Appl Microbiol Biotechnol*. doi: 10.1007/s00253-014-5981-3
- Song Y, Yang R, Guo Z et al. (2000). Distinctness of spore and vegetative cellular fatty acid profiles of some aerobic endospore-forming *Bacilli*. *J Microbiol Methods*. doi: 10.1016/S0167-7012(99)00123-2
- Su C, Lei L, Duan Y et al. (2012). Culture-independent methods for studying environmental microorganisms: methods, application, and perspective. *Appl Microbiol Biotechnol*. doi: 10.1007/s00253-011-3800-7
- Suutari M, Laakso S. (1994) Microbial fatty acids and thermal adaptation. *Crit Rev Microbiol*. doi: 10.3109/10408419409113560
- Tamura K, Peterson D, Peterson N et al. (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol*. doi: 10.1093/molbev/msr121

Надійшла в редакцію 12.05.21
Після доопрацювання 01.06.21
Прийнята до друку 18.11.21