

Таксономічне положення штаму *Bacillus* sp. 10.1 – ефективного альгіцидного агента

Н.П. Рибальченко, М.А. Хархота, Л.Б. Зелена, Л.В. Авдєєва

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

Мета. Видова ідентифікація штаму *Bacillus* sp. 10.1 на основі ознак фенотипу та спорідненості нуклеотидної послідовності гена 16S рРНК. **Методи.** Вивчення культурально-морфологічних та фізіолого-біохімічних властивостей штаму *Bacillus* sp. 10.1 проводили згідно з методичними рекомендаціями щодо виділення та ідентифікації бактерій роду *Bacillus*. Жирнокислотний склад клітинних ліпідів вивчали методом хромато-мас-спектрометрії. Ампліфікування нуклеотидної послідовності гена 16S рРНК здійснювали, використовуючи праймери 27f і 1492r, згідно з стандартним протоколом. Дендрограму філогенетичних відносин будували із застосуванням методу найближчого зв'язування (*Neighbor Joining*) та з використанням двухпараметричної моделі Кімури за 100 репліками бутстреп-аналізу. **Результати.** Проведено філогенетичний аналіз штаму *Bacillus* sp. 10.1, активного щодо мікроскопічних водоростей *Anabaena hassalii*, *Microcystis aeruginosa*, *M. pulvereae*. Встановлено, що за сукупністю культурально-морфологічних та фізіолого-біохімічних ознак досліджуваній штам відноситься до виду *B. atyloliquefaciens*. Для уточнення таксономічного положення штаму *Bacillus* sp. 10.1 вивчено жирнокислотний склад клітинної стінки та проведено аналіз нуклеотидної послідовності гена 16S рРНК. **Висновки.** На основі аналізу спорідненості нуклеотидної послідовності гена 16SpРНК з типовими представниками роду *Bacillus* досліджуваній штам *Bacillus* sp. 10.1 віднесено до виду *B. velezensis*. Нуклеотидну послідовність гена 16SpРНК штаму *Bacillus* sp. 10.1 внесено до бази даних GenBank та зареєстровано під номером KX962173.

Ключові слова: бактерії роду *Bacillus*, філогенетичний аналіз, *B. atyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis*.

Аеробні спороутворюючі бактерії роду *Bacillus* – одна з найбільш розповсюджених та найбільш відомих груп мікроорганізмів у природі. У 2015 році цей рід містив близько 299 видів і 7 підвидів [1]. Бактерії роду *Bacillus* здатні колонізувати найрізноманітніші ніші та включають в себе штами з економічними і медичними інтересами [2]. Серед мікроорганізмів, які продукують біологічно активні сполуки різної спрямованості, бактерії роду *Bacillus* займають особливе місце [3].

В останні роки значний інтерес вчені проявляють до біологічних агентів, зокрема бактерій, що пригнічують розвиток мікроскопічних водоростей. Проводиться інтенсивний пошук нових штамів бактерій роду *Bacillus* з альгіцидною активністю щодо синьо-зелених водоростей [4 – 6].

Раніше за результатами скринінгу, проведеного серед 135 штамів бактерій роду *Bacillus* з колекції відділу антибіотиків Інституту мікробіології і вірусології та виділених з різних природних джерел, було відібрано штами, високо активні щодо мікроскопічних водоростей *Anabaena hassalii*,

Microcystis aeruginosa, *M. pulverea* [7]. Найбільш активним виявився штам *Bacillus sp.* 10.1, який може бути використано для розробки препарату для біологічного контролю чисельності міководоростей.

З огляду на вищевикладене, метою наших досліджень було встановлення видової приналежності штаму *Bacillus sp.* 10.1 на основі аналізу ознак фенотипу та спорідненості нуклеотидної послідовності гена 16S рРНК.

Матеріали та методи. Об'єктом досліджень був виділений з ґрунту штам *Bacillus sp.* 10.1, який мав виражену альгіцидну активність щодо синьо-зелених водоростей *Anabaena hassalii*, *Microcystis aeruginosa*, *M. pulverea*.

Культуральні та морфологічні властивості вивчали при вирощуванні досліджуваного штаму на м'ясо-пептонному агарі (МПА) та Luria-Bertani (LB)-середовищі при температурі 37°C впродовж 24 годин.

Фізіолого-біохімічні дослідження штаму *Bacillus sp.* 10.1 проводили згідно з методичними рекомендаціями щодо виділення та ідентифікації бактерій роду *Bacillus* [8, 9]. Для ідентифікації використовували наступні тести: морфологія клітин і спор, реакція Фогес-Проскауера, оксидазна реакція, здатність гідролізувати ескулін, казеїн, крохмаль, розкласти сечовину, зброджувати целобіозу, фруктозу, галактозу, лактозу, манозу, рафінозу, саліцин, ксилозу; утилізувати цитрат, сукцинат; рости при температурі 50°C, у присутності 10% NaCl; відновлювати нітрат [10]. Аналіз отриманих результатів обробляли в програмі Identax.

Жирнокислотний склад клітинних ліпідів (метилових ефірів жирних кислот) вивчали методом хромато-мас-спектрометрії. Дослідження проводили на хроматографі Agilent 6890N з мас-спектрометричним детектором Agilent 5973 inert (капілярна колонка HP-5MS (J&W Scientific, USA)). Розділення проводили за градієнтом температури 4°C/хв від 150 до 250°C, газ-носії – гелій, швидкість потоку колонки 1 мл/хв. Для аналізу складу клітинних ліпідів до промитої фізіологічним розчином добової культури додавали 2% розчин хлористого ацетилю в метанолі і витримували при 80°C протягом 2 годин. Метиліові ефіри тричі екстрагували гептаном і упарювали до 200 мкл [11]. Обробку даних хромато-мас-спектрометричного аналізу проводили за допомогою комп'ютерної програми ChemStation та інтегрованої бази даних мас-спектрів NIST 02, а також стандарту метилових ефірів жирних кислот бактерій (Supelco, № 4708-U, USA). Вміст жирних кислот виражали у відсотках від загальної суми площ піків [12].

Визначення і аналіз нуклеотидної послідовності гена 16S рРНК. Ампліфікацію гена 16S рРНК проводили з праймерами 27f і 1492r згідно стандартного протоколу [13]. Очищений ПЛР-продукт секвенували у двох напрямках на приладі «Genetic Analyzer 3130» з набором реактивів «BigDye Terminatorv 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 елаймент нуклеотидних послідовностей гена 16S рРНК представників різних видів роду *Bacillus* здійснювали, як описано у роботі [14]. Дендрограму філогенетичних зв'язків будували з використанням методу найближчого зв'язування (Neighbor Joining) та двохпараметричної моделі Кімури за

100 репліками бутстреп-аналізу у програмі MEGA 5 [15]. Послідовності гена 16S рРНК типових культур бактерій роду *Bacillus* були отримані з бази даних GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) і веб-ресурсу www.straininfo.net.

Результати та їх обговорення. Для встановлення таксономічного положення *Bacillus sp.* 10.1 досліджено його морфолого-культуральні властивості. Встановлено, що досліджуваний штам *Bacillus sp.* 10.1 на агаризованому середовищі МПА, картопляному агарі, середовищі Громико утворював колонії бежевого матового кольору діаметром близько 5 – 7 мм, пастоподібної консистенції, круглої форми, з опуклим профілем, фестончатим краєм, однорідної структури і щільної консистенції. При рості на МПБ штам *Bacillus sp.* 10.1 утворював плівку.

У фарбованих за Грамом препаратах 18-24-годинної культури відмічено поодинокі або розміщені короткими ланцюжками грампозитивні клітини (2,5×0,4 мкм) з ендоспорами, розташованими по центру, що не змінюють форму клітини. У результаті дослідження фізіолого-біохімічних властивостей встановлено, що штам *Bacillus sp.* 10.1 є аеробом. Даний штам здатен використовувати глюкозу, фруктозу, манозу як єдине джерело живлення з утворенням кислоти (табл. 1). Однак він не ферментував рафінозу, лактозу, галактозу, целобіозу, ксилозу. Досліджуваний штам давав позитивну реакцію Фогес-Проскауера, гідролізував крохмал, казеїн, желатин, відновлював нітрати до аміаку, утворював сірководень. Штам *Bacillus sp.* 10.1 утилізував сукцинат, але не використовував цитрат. Даний штам не ріс при 10% NaCl та за температури 50°C, а також він не утворював газ з NO₃ в анаеробних умовах. Штам *Bacillus sp.* 10.1 здатен утворювати каталазу та оксидазу.

На основі отриманих характеристик за допомогою комп'ютерної програми Identax, яка враховує 25 морфологічних, культуральних, фізіолого-біохімічних ознак, найбільш близьким видом до досліджуваного штаму *Bacillus sp.* 10.1 був *B. amyloliquefaciens* (83,34% спорідненості). Незважаючи на фенотипову подібність, відмічено, що штам *Bacillus sp.* 10.1 мав декілька нетипових для представника виду *B. amyloliquefaciens* біохімічних ознак, а саме: не зброджував рафінозу, целобіозу, не утилізував цитрат та не ріс за температури 50°C.

Згідно з вимогами сучасної таксономії за наведеними вище ознаками ідентифікувати даний штам на рівні виду є вкрай складно. Тому для уточнення таксономічного положення досліджуваного штаму нами був вивчений жирнокислотний склад клітинної стінки *Bacillus sp.* 10.1.

З літератури відомо, що вміст жирних кислот у клітинній стінці бактерій – важлива таксономічна ознака. Крім того, склад жирних кислот бактеріальних клітин варіює залежно від виду і, таким чином, використовується як біомаркер в систематиці протягом багатьох років [17]. Тому деякі композиції жирних кислот є загальними для видів *Bacillus*, в той час як інші є специфічними для певних груп і окремих видів. Зокрема відомо, що домінування розгалужених жирних кислот у клітинних стінках є характерною ознакою бактерій роду *Bacillus*. За даними Kaneda T. вміст розгалужених жирних кислот у представників даного роду складає від 54 до 85% загального жирнокислотного пулу клітини, включаючи як на-

сичені, так і ненасичені кислоти з переважанням ізо- та антеізо- C_{15:0} і C_{17:0} жирних кислот [18, 19].

Вміст жирних кислот штаму *Bacillus sp.* 10.1 та контрольних штамів *B. subtilis* УКМ В-5006^т, *B. amyloliquefaciens* DSM 7, *B. velezensis* CR 502 наведено у таблиці 2.

Виявлено, що досліджені штами мають значний вміст розгалужених жирних кислот (ізо- і антеізо- C_{15:0} та C_{17:0}), сумарна кількість яких складає 90% від загального жирнокислотного пулу. За своїм жирнокислотним профілем ці штами подібні, однак відрізняються як від представників виду *B. subtilis*, так і від підвидів *B. amyloliquefaciens*. Відмінною особливістю штаму *Bacillus sp.* 10.1 є відносно високий вміст гексадеканової кислоти (C_{16:0}) в межах 7 – 10%, що є також характерною особливістю для *B. velezensis* CR 502^т [22]. Вміст ізо C_{15:0} у *B. velezensis* близький до даних, отриманих для штаму *Bacillus sp.* 10.1, та складає 29,86 і 22,60% відповід-

Таблиця 1

Фенотипові властивості штаму *Bacillus sp.* 10.1 та типового представника *B. amyloliquefaciens* DSM 7

Фізіолого-біохімічні ознаки		<i>Bacillus sp.</i> 10.1	Типовий штам <i>B. amyloliquefaciens</i> DSM 7 [16]
Фарбування за Грамом		+	+
Ріст	аеробний	+	+
	анаеробний	-	-
Реакція Фогес-Проскауера		+	+
Редукція нітратів		+	+
Гідроліз	крохмалю	+	+
	казеїну	+	+
	желатину	+	+
Утилізація	цитрату	-	+
	сукцинату	+	+
Наявність	уреази	-	н
	каталази	+	+
Ріст за концентрації NaCl у середовищі	7%	+	н
	10%	-	в
Ріст за температури, °С	30	+	+
	50	-	+
Здатність ферментувати вуглеводи з утворенням кислоти	глюкозою	+	+
	фруктозою	+	+
	галактозою	-	-
	лактозою	-	-
	манозою	+	в
	рафінозою	-	+
	ксилозою	-	в
целобіозою	-	+	

Примітка: «+» – наявність ознаки, «-» – відсутність ознаки, «н» – дані не наведено, «в» – ознака варіабельна.

но від загальної площі піків. В жирнокислотному профілі досліджуваного штаму також встановлено наявність насичених ізомерів C_{14:0} (0,47%) та C_{18:0} (1,43%) в слідових кількостях, що є характерним і для контрольних штамів.

Отримані дані вказують на подібність жирнокислотного складу штаму *Bacillus sp.* 10.1 та *B. velezensis* CR 502. Однак відомо, що кількісне співвідношення різних типів жирних кислот може змінюватися в залежності від середовища та умов культивування [23].

Тому для більш точної видової ідентифікації нами було проведено аналіз нуклеотидної послідовності 16SpPНК. Порівняльний аналіз секвованого фрагмента гена 16SpPНК штаму *Bacillus sp.* 10.1 за допомогою програми BLAST виявив 99% ідентичності з представниками декількох видів роду *Bacillus*, а саме: *B. methylotrophicus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. velezensis* та *B. subtilis*. На основі визначення спорідненості нуклеотидних послідовностей гена 16S рPНК була побудована дендрограма (рис. 1), яка об'єднує в одну групу види *B. subtilis*, *B. methylotrophicus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. velezensis*, що є філогенетично спорідненими.

З метою уточнення видової приналежності досліджуваного штаму *Bacillus sp.* 10.1 був проведений аналіз гіперваріабельної ділянки гена 16SpPНК типових представників інших видів роду *Bacillus*. В результаті порівняльного аналізу послідовностей варіабельного фрагмента гена 16SpPНК нами було виявлено 6 сайтів варіабельності, за якими можна було відрізнити споріднені види і підвиди групи *B. subtilis*.

По отриманим нуклеотидним послідовностям генів 16SpPНК досліджуваного штаму *Bacillus sp.* 10.1, а також по даним, доступним із бази даних GenBank, були виявлені сайти варіабельності для споріднених видів роду *Bacillus*: колекційних типових штамів *B. subtilis* підвидів *subtilis* і *spizizenii*, *B. amyloliquefaciens*, *B. atrophaeus*, *B. mojavensis*, *B. vallismortis*,

Таблиця 2

Жирнокислотний склад клітинної стінки бактерій роду *Bacillus*

Жирні кислоти	Вміст жирних кислот,%			
	<i>Bacillus sp.</i> 10.1	<i>B. subtilis</i> УКМ В-5006т	<i>B.</i> <i>amyloliquefaciens</i> DSM 7т	<i>B. velezensis</i> CR 502т
ізо- або антеізо C14	0,47	0	0,99	1,08
ізо C15:0	22,60	17,75	40,29	29,86
антеізо C15:0	47,34	42,94	28,32	32,70
C15:0	0	0	0	0
ізо C16:0	0	2,26	2,13	1,31
C16:0	7,94	5,65	0	13,41
ізо C17:0	8,35	11,20	13,14	7,67
антеізо C17:0	11,88	17,89	0	4,27
C18:0	1,43	2,29	0	0

Примітка: *B. amyloliquefaciens* DSM 7 (Borris et al., 2011), *B. velezensis* CR 502^т (Ruiz-Garcia et. al., 2005) [20, 21].

Таблиця 3

Варіабельність нуклеотидних послідовностей гена 16SpРНК у видів бактерій, що належать до групи *B. subtilis*

Вид, штамп	Позиція 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	G	C	G	G	C	G	G	A	C
<i>B. velezensis</i> CR-502T	G	T	G	A(G)	C	A	G	A	C
<i>Bacillus</i> sp. 10.1	G	T	G	G	C	A	-	-	-
<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 у різних алелях гена.

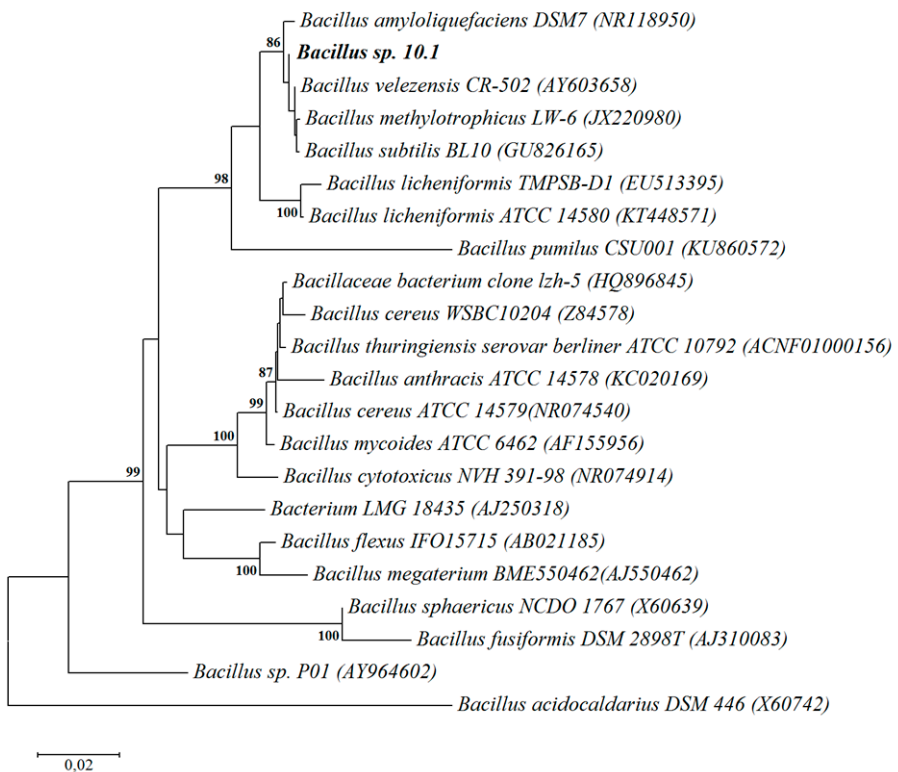


Рис.1. Дендрограма філогенетичних зв'язків штаму *Bacillus* sp. 10.1 з типовими штамми бактерій роду *Bacillus*

B. velezensis, а також штамів з Української колекції мікроорганізмів *B. amyloliquefaciens subsp. plantarum* UCM B-5017, UCM B-5044 та *B. subtilis* UCM B-5049, UCM B-5137. Результати елайменту нуклеотидних послідовностей гена 16S рРНК досліджуваного штаму *Bacillus sp.* 10.1 показали значну його подібність до виду *B. velezensis* (табл. 3).

За останні роки з використанням сучасних генетичних методів досліджень стало відомо, що вид *B. subtilis* складається з групи видів і підвидів, які значно філогенетично споріднені. Тому їх дуже важко відрізнити за допомогою класичних параметрів таксономії. Деякі відмінності полягають у нуклеотидному складі бактеріального геному, співвідношенні окремих жирних кислот, що входять до клітинної стінки, синтезі деяких вторинних метаболітів тощо. До цієї групи мікроорганізмів відносять види *B. amyloliquefaciens*, *B. atrophaeus*, *B. mojavensis*, *B. vallismortis* та *B. velezensis*. Відповідно до сучасної систематики у різний час таксономічні (видові) назви змінювали у межах цієї групи. Так, *B. amyloliquefaciens* сьогодні називають *B. methylophilicus* і *B. velezensis*. [5].

За результатами наших досліджень на основі культурально-морфологічних і фізіолого-біохімічних ознак досліджуваній штаму *Bacillus sp.* 10.1 виявився близьким до типового штаму *B. amyloliquefaciens* DSM 7 і початково був віднесений до виду *B. amyloliquefaciens*. Однак за даними аналізу жирнокислотного складу клітинної стінки бактерій роду *Bacillus* та гіперваріабельної ділянки гена 16S рРНК штаму *Bacillus sp.* 10.1 значно споріднений з видом *B. velezensis*. Тому досліджуваний штаму *Bacillus sp.* 10.1 віднесено до виду *B. velezensis*. Нуклеотидні послідовності гена 16S рРНК даного штаму внесено до бази даних GenBank та зареєстровано під номером KX962173.

ТАКСОНОМИЧЕСКОЕ ПОЛОЖЕНИЕ ШТАММА *BACILLUS SP.* 10.1 - ЭФФЕКТИВНОГО АЛЬГИЦИДНЫМИ АГЕНТА

Н.П. Рыбальченко, М.А. Хархота, Л.Б. Зеленая, Л.В. Авдеева

*Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев, 03143, Украина*

Резюме

Цель. Видовая идентификация штамма *Bacillus sp.* 10.1 на основе признаков фенотипа и средства нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК. **Методы.** Изучение культурально-морфологических и физиолого-биохимических свойств штамма *Bacillus sp.* 10.1 проводили согласно методическим рекомендациям по выделению и идентификации бактерий рода *Bacillus*. Жирнокислотный состав клеточных липидов изучали методом хромато-масс-спектрометрии. Амплификацию нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК осуществляли, используя праймеры 27f и 1492r, согласно стандартного протокола. Дендрограмму филогенетических связей строили с применением метода ближайшего связывания (Neighbor Joining) и с использованием двухпараметрической модели Кимуры за 100 репликами бутстреп-анализа. **Результаты.** Проведен филогенетический анализ штамма *Bacillus sp.* 10.1, активно против микроскопических водорослей *Anabaena hassalii*, *Microcystis aeruginosa*, *M. pulvereae*. Установлено, что по совокупности культурально-морфологических

и физиолого-биохимических признаков исследуемый штамм относится к виду *B. amyloliquefaciens*. Для уточнения таксономического положения штамма *Bacillus* sp. 10.1 изучен жирнокислотный состав клеточной стенки и проведен анализ нуклеотидной последовательности гена 16S рPHK. **Выводы.** На основе анализа родства нуклеотидной последовательности гена 16SpPHK с типичными представителями рода *Bacillus* исследуемый штамм *Bacillus* sp. 10.1 отнесен к виду *B. velezensis*. Нуклеотидная последовательность гена 16SpPHK штамма *Bacillus* sp. 10.1 внесена в базу данных GenBank и зарегистрирована под номером KX962173.

Ключевые слова: бактерии рода *Bacillus*, филогенетический анализ, *B. amyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis*.

TAXONOMIC POSITION OF THE STRAIN BACILLUS SP. 10.1 AS EFFECTIVE ALGICIDAL AGENT

Rybalchenko N.P., Kharkhota M.A., Zelena L.B., Avdeeva L.V.

*Zabolotny Institute of Microbiology and Virology NAS of Ukraine,
Zabolotny Str. 154, Kyiv, 03143, Ukraine*

Summary

Aim. Identification of *Bacillus* sp. 10.1 using phenotype characteristics and sequencing of 16S rRNA gene. **Methods.** Cultural, morphological, and physiological characteristics of the strain *Bacillus* sp. 10.1 were studied using guidelines of isolation and identification of bacteria of the genus *Bacillus*. Composition of fatty-acid of the cellular lipids were identified by the chromatography-mass spectrometry. The 16S rRNA genes were amplified by PCR using primers 27f and 1492r, according to standard protocol. Phylogenetic tree, constructed using the neighbour-joining method and using the model Kimura 2 parameter. Bootstrap analysis was applied using 100 bootstrap replicas. **Results.** The strain of *Bacillus* sp.10.1 inhibited the growth of cyanobacteria *Anabaena hassalii*, *Microcystis aeruginosa*, *M. pulvereae*. Cultural, morphological, and physiological characteristics of the strain *Bacillus* sp. 10.1 had been studied. It was showed that the studied strain belongs to the species *B. amyloliquefaciens*. To clarify the taxonomic position of the strain *Bacillus* sp. 10.1 had been studied the composition of fatty-acid of the cell wall and sequencing of 16S rRNA gene. **Conclusions.** Based on the analysis of nucleotide sequence of 16S rRNA gene the studied strain *Bacillus* sp. 10.1 had been classified as a *B. velezensis*. The sequence of 16S rRNA gene added to the database GenBank and accession number for the 16S rRNA of *Bacillus* sp. 10.1 are KH962173.

Keywords: genus *Bacillus*, phylogenetic analysis, *B. amyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis*.

1. *Euzeby, J.* (2015). List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature [Online]. Available: <http://www.bacterio.net.sci-hub.cc/> [Accessed May 13, 2015].
2. *Guinebretiere M., Auger S., Galleron N., Contzen M., De Sarrau B., De Buyser M., et al.* *Bacillus cytotoxicus* sp. nov. is a new thermotolerant species of the *Bacillus cereus* group occasionally associated with food poisoning // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2013. – 63. – P. 31–40.
3. *Diomandé S. E., Nguyen-The C., Guinebretière M.-H., Broussolle V., Brillard J.* Role of fatty acids in *Bacillus* environmental adaptation // *Front. Microbiol.* – 2015. – V.6. –

4. Fulbright S.P., Chisholm S., Reardon K.F. Growth inhibition of *Nannochloropsis* species by *Bacillus pumilus* // *Algal Research* – 2016. – V.20 (2016) – P. 70 – 76.
5. Fan B., Blom J., Klenk H.-P., Borriss R. *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis*, and *Bacillus siamensis* Form an “Operational Group *B. amyloliquefaciens*” within the *B. subtilis* Species Complex // *Front. Microbiol.* – 2017. – V. 8. – P. 22 – 34.
6. Dunlap C.A., Kim S.-J., Kwon S.-W., Rooney A.P. *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 // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* – 2016. – 66. – P. 1212 – 1217.
7. Rybalchenko N.P., Kharkhota M.A., Lapa S.V., Avdeeva L.V. Alga-lysing properties of *Bacillus* sp. // *Studia Biologica* – 2015 – V. 9, №2 – P. 5 – 12.
8. Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology/D.J. Brenner, N.R. Krieg, J.T.Staley, G.M.Garrity. – N.Y.:Springer, 2005. – V.2. – 1108 p.
9. Смирнов В.В., Резник С.Р., Сорокулова И.Б. Методические рекомендации по выделению и идентификации бактерий рода *Bacillus* из организма человека и животных/ Киев, 1983. – 50 с.
10. Flores O., Belanche L.A., Blanch A.R. New multiplatform computer program for numerical identification of microorganism // *Journal Clinical Microbiology.* – 2009. – V. 47. – P. 4133 – 4135.
11. Safronova L.A., Zelena L.B., Klochko V.V., Reva O.N. Does the applicability of bacillus strains in probiotics rely upon their taxonomy // *Can. J. Microbiol.* – 2012. – Vol. 58. - № 2. – P. 212 – 219.
12. Іваниця В.О., Горшкова О.Г., Коротаєва Н.В., Волювач О.В., Гудзенко Т.В., Остапчук А.М. Склад жирних кислот ліпідів штаму *Bacillus* sp. O3-5, виділеного із забрудненого нафтою ґрунту о. Зміїний // *Мікробіологія і біотехнологія.* – 2015. – №4. – С. 28-35.
13. Lane D.G. Nucleic acids techniques in bacterial systematic // Edited by E. Stackebrandt and M. Goodfellow. – Chichester, United Kingdom: John Wiley. – 1991. – P.115-175.
14. Reva ON, Sorokulova IB, Smirnov VV. Simplified technique for identification of the aerobic spore-forming bacteria by phenotype // *Int J Syst Evol Microbiol.* – 2001. – 51(Pt 4). – P. 1361 – 1371.
15. 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 // *Molecular Biology and Evolution.* – 2011. – V. 28. – P. 2731 – 2739.
16. De Vos P, Garrity G.M. et al. The Firmicutes. Bergey’s manual of systematic bacteriology 3 (2nd ed.). – New York: Springer, 2009. – 1450 p.
17. Guinebretiere M., Auger S., Galleron N., Contzen M., De Sarran B., De Buyser H. et al. *Bacillus cutotoxicus* sp. nov. is a new thermotolerant species of the *Bacillus cereus* group occasionally associated with food poisoning // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2013. – 63. – P. 31 – 40.
18. Kaneda T. Fatty acids of the genus *Bacillus*; an example of branched-chain preferences // *Bacteriol. Rev.* – 1977. – 41, N2. – P. 391 – 418.
19. Song Y., Yang R., Guo Z., Zhang M., Wang X., Zhou F. Distinctness of spore and

- vegetative cellular fatty acid profiles of some aerobic endospore-forming bacilli // J. Microbiol. Methods. – 2000. – 39 (3). – P. 225 – 241.
20. Borriss R., Chen X.-H., Rueckert C. et al. Relationship of *Bacillus amiloliquefaciens* clades associated with strains DSM7T and FZB42: a proposal for *Bacillus amiloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* subsp. nov. and *Bacillus amiloliquefaciens* subsp. *plantarum* subsp. nov. based on their discriminating complete genome sequences // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2011. – P. 232 – 267.
21. Ruiz-Garcia C, Bejar V, Martinez-Checa F, Llamas I, 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. – V.55. – P. 191–195.
22. Connor N., Sikorski J., Rooney P. et al. Ecology of speciation of the genus *Bacillus* // Appl. Environ. Microbiol.– 2010. – 76. – P. 1349 – 1358.
23. Ehrhardt C.J., Chu V., Brown T.C. et al. Use of fatty acid methyl ester profiles for discrimination of *Bacillus cereus* T-strain spores grown on different media // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2010. – V. 76, № 6. – P. 1902–1912.

Отримана 1.03.2017