
ГЕНЕТИКА И МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY

УДК 579.22

БИОХИМИЧЕСКАЯ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРИЙ *BACILLUS PUMILUS*, ИЗОЛИРОВАННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ БЕЛАРУСИ

О. В. ЕВДОКИМОВА¹⁾, В. Е. МЯМИН^{1), 2)}, Л. Н. ВАЛЕНТОВИЧ^{1), 2)}

¹⁾Институт микробиологии НАН Беларуси, ул. Купревича, 2, 220141, г. Минск, Беларусь

²⁾Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь

Исследованы физиолого-биохимические и молекулярно-генетические свойства бактерий *Bacillus pumilus*, изолированных из растений с признаками бактериального поражения, и штаммов, выделенных из почвы на территории Беларуси. Установлено, что изоляты из растений незначительно отличались от почвенных штаммов по фенотипическим признакам, вариации касались только целлюло- и пектолитической активности. Однако типирование с помощью RAPD- и REP-ПЦР выявило высокую генетическую гетерогенность исследованных штаммов, что может свидетельствовать о вариабельности структуры геномов бактерий *B. pumilus* из различных мест обитания.

Образец цитирования:

Евдокимова О. В., Мямин В. Е., Валентович Л. Н. Биохимическая и молекулярно-генетическая характеристика бактерий *Bacillus pumilus*, изолированных на территории Беларуси // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. 2018. № 1. С. 38–49.

For citation:

Evdokimova O. V., Miamin V. E., Valentovich L. N. Biochemical and molecular genetic characteristics of *Bacillus pumilus* bacteria isolated in Belarus. *J. Belarus. State Univ. Biol.* 2018. No. 1. P. 38–49 (in Russ.).

Авторы:

Олеся Владимировна Евдокимова – научный сотрудник лаборатории «Центр аналитических и генно-инженерных исследований».

Владислав Евгеньевич Мямин – кандидат биологических наук, доцент; старший научный сотрудник лаборатории средств биологического контроля¹⁾; доцент кафедры микробиологии биологического факультета²⁾.

Леонид Николаевич Валентович – кандидат биологических наук, доцент; заведующий лабораторией «Центр аналитических и генно-инженерных исследований»¹⁾; доцент кафедры молекулярной биологии биологического факультета²⁾.

Authors:

Olesia V. Evdokimova, researcher at the laboratory «Center of analytical and genetic engineering research».

evdokimovalesia@gmail.com

Vlad E. Miamin, PhD (biology), docent; senior researcher at the laboratory of biological control agents^a; associate professor at the department of microbiology, faculty of biology^b.

vladmiamin@mail.ru

Leonid N. Valentovich, PhD (biology), docent; head of the laboratory «Center of analytical and genetic engineering research»^a; associate professor at the department of molecular biology, faculty of biology^b.

valentovich@mbio.bas-net.by

Ключевые слова: *Bacillus pumilus*; RAPD-ПЦР; REP-ПЦР; генетическая гетерогенность.

Благодарность. Авторы выражают благодарность ассистентам биологического факультета БГУ Е. И. Комар (кафедра микробиологии) и Ю. Н. Горовику (кафедра молекулярной биологии) за предоставленные штаммы бактерий *B. pumilus*.

BIOCHEMICAL AND MOLECULAR GENETIC CHARACTERISTICS OF *BACILLUS PUMILUS* BACTERIA ISOLATED IN BELARUS

O. V. EVDOKIMOVA^a, V. E. MIAMIN^{a, b}, L. N. VALENTOVICH^{a, b}

^aInstitute of Microbiology, National Academy of Sciences of Belarus, 2 Kuprevič Street, Minsk 220141, Belarus

^bBelarusian State University, 4 Niezaliežnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus

Corresponding author: O. V. Evdokimova (evdokimovalesia@gmail.com)

Physiological biochemical and molecular genetic properties of *Bacillus pumilus* bacteria isolated from affected plants and soil in Belarus have been studied. There were no significant phenotypical differences between bacteria isolated from plants and soil, only distinctions in cellulolytic and pectolytic activity were observed. However, RAPD- and REP-PCR typing revealed high genetic heterogeneity of studied isolates, which may indicate variability of genome structure of *B. pumilus* bacteria from various habitats.

Key words: *Bacillus pumilus*; RAPD-PCR; REP-PCR; genetic heterogeneity.

Acknowledgements. The authors would like to thank E. I. Komar (Belarusian State University, department of the microbiology) and Y. N. Gorovik (department of the molecular biology) for provided *B. pumilus* strains.

Введение

В настоящее время отмечается значительный рост числа исследований, объектом которых являются бактерии *Bacillus pumilus*. Основной интерес к представителям данного вида связан со способностью отдельных штаммов продуцировать биологически активные вещества. Ряд внеклеточных ферментов *B. pumilus*, в том числе щелочная сериновая протеаза [1], ксиланаза [2], карбоксиметилцеллюлаза [3], β-маннаназа [4], лакказы [5], могут найти применение в различных областях биотехнологической промышленности. Синтез вторичных метаболитов с выраженной антибактериальной активностью и физиологически активных регуляторов роста растений делает представителей этого вида перспективными для разработки средств биологического контроля [6; 7] и препаратов, стимулирующих рост растений [8–10]. В то же время в литературе описаны случаи развития тяжелых форм бактериемии и сепсиса [11–13], пищевых отравлений [14], карбункулоподобных поражений кожных покровов [15], вызванных *B. pumilus*. Обнаружены штаммы *B. pumilus*, являющиеся причиной заболевания растений, на территории Египта [16], Мали [17], Китая [18; 19], Испании [20], Турции [21], Польши [22], а в последние годы и Беларуси [23; 24].

Считается, что такая широкая внутривидовая вариабельность свойств бактерий, адаптация к нетипичным условиям обитания, приобретение новых признаков отдельными штаммами – следствие динамичности и постоянной эволюции бактериального генома. Согласно современным представлениям внутривидовые различия обусловлены не только перестройками нуклеотидной последовательности отдельных генов, но и приобретением или утратой целого гена или даже кластера генов. Горизонтальный перенос ДНК играет значительную роль в распространении генетических детерминант, в том числе кодирующих факторы вирулентности [25]. Поиск генов, полученных в результате латерального переноса в полногеномных последовательностях 24 видов бактерий и архей, показал, что их доля колеблется от 1,56 до 14,47 %. Высокое содержание чужеродных генов регистрировалось у представителей вида *Bacillus subtilis*. В геномах архей и непатогенных бактерий количество заимствованных генетических детерминант было выше по сравнению с патогенными бактериями [26]. Например, в геноме штамма *B. pumilus*, изолированного из прибрежных вод Индии, выявлен ген *cesB*, кодирующий цереулидсинтеазу – один из ферментов, необходимых для образования термостабильного токсина цереулида [27]. Кластер генов, кодирующих нерибосомный синтез токсического пептида, несет в себе плазмиду pCER270, обнаруживаемая в клинических изолятах *Bacillus cereus* [28]. Присутствие гена *cesB* в геноме *B. pumilus* подтверждает возможность переноса ДНК между видами, относящимися к разным филогенетическим группам рода *Bacillus*.

Первые работы, описывающие фитопатогенные свойства *B. pumilus*, появились относительно недавно (2006) [16; 21]. Ранее встречались сообщения о способности данных бактерий вызывать мягкую гниль в различных овощах и фруктах [29; 30], однако в связи с их повсеместным распространением и традиционным отнесением к непатогенным особую внимания этим фактам не уделялось. В настоящее время выявлено и изучено более десяти штаммов *B. pumilus*, вызывающих заболевания растений [16–22; 24], но о механизмах патогенеза и свойствах, позволивших им перейти к паразитическому образу жизни, известно немного. До сих пор неясно, насколько специализированы в качестве фитопатогенов представители вида *B. pumilus* (как изменяются физиолого-биохимические свойства по сравнению со свободноживущими штаммами, есть ли существенные модификации в геномах данных бактерий).

Достаточно эффективными и быстрыми способами выявления внутривидового генетического разнообразия бактерий являются молекулярные методы на основе ПЦР. Из них наиболее часто применяются REP-ПЦР (*repetitive element palindromic PCR*) с использованием праймеров, комплементарных консервативным повторяющимся последовательностям ДНК [31], и RAPD-ПЦР (*random amplification of polymorphic DNA*), основанная на случайной амплификации полиморфной ДНК [32].

Целью настоящей работы является сравнение физиолого-биохимических и молекулярно-генетических характеристик бактерий *B. pumilus*, изолированных из растений с внешними признаками заболевания и из почвы на территории Беларуси.

Материалы и методы исследований

В эксперименте были использованы 6 штаммов *B. pumilus* из фонда Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов и 34 штамма из рабочих коллекций биологического факультета БГУ и лаборатории «Центр аналитических и генно-инженерных исследований» Института микробиологии НАН Беларуси (табл. 1). Принадлежность анализируемых штаммов к виду *B. pumilus* была подтверждена с помощью ПЦР с видоспецифическими праймерами [33].

Таблица 1

Штаммы *B. pumilus*, использованные в эксперименте

Table 1

Investigated in the study *B. pumilus* strains

Штамм	Источник выделения	Место выделения
36.2	Растения огурца (<i>Cucumis sativus</i>), сорт Кураж	УП «Минский парниково-тепличный комбинат», Минский р-н, Минская обл.
19.6	Растения томата (<i>Solanum lycopersicum</i>), сорт Эмоушен	КСУП «Светлогорская овощная фабрика», Светлогорский р-н, Гомельская обл.
39.2	Растения томата (<i>Solanum lycopersicum</i>), сорт Раиса	УКАП «Фирма “Днепр”», Могилёвский р-н, Могилёвская обл.
39.3	Растения томата (<i>Solanum lycopersicum</i>), сорт Раиса	
32.8	Растения томата (<i>Solanum lycopersicum</i>), сорт Бомакс	
44.2	Растения томата (<i>Solanum lycopersicum</i>), сорт Раиса	
37.7	Растения томата (<i>Solanum lycopersicum</i>), сорт Раиса	ЧУП «Озерицкий-Агро», Смолевичский р-н, Минская обл.
38.2	Растения томата (<i>Solanum lycopersicum</i>), сорт Зук	
51.2	Растения томата (<i>Solanum lycopersicum</i>), сорт Раиса	
40.2	Растения томата (<i>Solanum lycopersicum</i>), сорт Старбак	КУП «Минская овощная фабрика», Минский р-н, Минская обл.
41.2	Растения томата (<i>Solanum lycopersicum</i>), сорт Раиса	
61.2	Растения томата (<i>Solanum lycopersicum</i>), сорт Жеронимо	
61.3		
T1		
T2		

Окончание табл. 1
Ending table 1

Штамм	Источник выделения	Место выделения
33.4	Растение томата (<i>Solanum lycopersicum</i>), сорт Барселона	РУП «Витебскэнерго» (филиал «Весна-энерго»), Полоцкий р-н, Витебская обл.
33.5		
4Л	Растения томата (<i>Solanum lycopersicum</i>), сорт Форонти	УП «Агрокомбинат “Ждановичи”», Минский р-н, Минская обл.
6Л	Растения томата (<i>Solanum lycopersicum</i>), сорт Форонти	
1MRL	Растения льна-долгунца (<i>Linum usitatissimum</i>), сорт Ива	Минский р-н, Минская обл.
11-1-1	Клубни картофеля (<i>Solanum tuberosum</i>), сорт Зарница	Бобруйский р-н, Могилёвская обл.
33-3	Клубни картофеля (<i>Solanum tuberosum</i>), сорт Журавинка	РУП «Институт защиты растений», Минский р-н, Минская обл.
21-3	Клубни картофеля (<i>Solanum tuberosum</i>), сорт Янка	
17-2	Клубни картофеля (<i>Solanum tuberosum</i>), сорт Выток	РСДУП «Экспериментальная база “Зазерье”», Пуховичский р-н, Минская обл.
6-5-2	Клубни картофеля (<i>Solanum tuberosum</i>), сорт Здабытак	
63-1-3	Клубни картофеля (<i>Solanum tuberosum</i>), сорт Бриз	КСУП «Экспериментальная база “Натальевск”», Червенский р-н, Минская обл.
63-2-2		
65-4	Клубни картофеля (<i>Solanum tuberosum</i>), сорт Атлант	ОАО «Экспериментальная база “Дашковка”», Могилёвский р-н, Могилёвская обл.
43-3-1	Клубни картофеля, сорт неизвестен	Личное подсобное хозяйство, д. Туры, Столинский р-н, Брестская обл.
71-4-1	Неизвестен	Неизвестно
P10	Растения сосны обыкновенной (<i>Pinus sylvestris</i>)	Мядельский р-н, Минская обл.
P107	Растения сосны обыкновенной (<i>Pinus sylvestris</i>)	Памятник природы республиканского значения «Дубрава» у д. Щемыслица, Минский р-н, Минская обл.
P109	Растения сосны обыкновенной (<i>Pinus sylvestris</i>)	
P110	Растения сосны обыкновенной (<i>Pinus sylvestris</i>)	д. Боровляны, Минский р-н, Минская обл.
БИМ В-171	Дерново-подзолистая почва	Полесский государственный радиационно-экологический заповедник, д. Кулажин, Брагинский р-н, Гомельская обл.
БИМ В-211	Почва березового леса	Полесский государственный радиационно-экологический заповедник, д. Лесок, Хойникский р-н, Гомельская обл.
БИМ В-369	Дерново-подзолистая почва	Полесский государственный радиационно-экологический заповедник, Гомельская обл.
БИМ В-373	Дерново-подзолистая почва	Ландшафтный заказник «Прилуцкий», Минский р-н, Минская обл.
БИМ В-401	Садово-огородная почва	
БИМ В-394	Дерново-подзолистая почва	аггородок Соколище, Россонский р-н, Витебская обл.

Бактерии выращивали на поверхности агаризованной полноценной питательной среды (LB) или картофельном агаре [34] при температуре 28 °C в течение 24 ч. Физиолого-биохимическую характеристику исследуемых бактерий изучали согласно стандартным методикам, принятым для видовой

идентификации бактерий [34; 35]. Способность роста в присутствии антибиотика исследовали, высевая бактерии на поверхность агаризованной среды *LB*, содержащей эритромицин (50 мкг/мл), ампициллин (50 мкг/мл), стрептомицин (50 мкг/мл), тетрациклин (5 мкг/мл) или канамицин (15 мкг/мл).

Геномную ДНК бактерий выделяли с помощью набора реагентов «Нуклеосорб С» производства ОДО «Праймтех» согласно инструкции производителя или с применением цетилтриметиламмония бромида (ЦТАБ) [36]. Для выявления генетической гетерогенности изучаемых штаммов использовали RAPD-ПЦР с праймером 1254 (5'-ccgcagccaa-3') и REP-ПЦР с праймером ERIC1 (5'-atgtaagctcctggggattcac-3'). Амплификацию проводили в 20 мкл реакционной смеси, содержащей АМ-буфер с $MgCl_2$ (ОДО «Праймтех»); 0,2 ммоль/л дезоксинуклеотидтрифосфатов; 0,5 ммоль/л праймера; 1 ед. *Taq*-полимеразы; 50 нг ДНК матрицы. Протокол амплификации включал в себя следующие стадии: начальную денатурацию – 5 мин при 95 °С; 4 цикла (денатурация – 5 мин при 94 °С, отжиг праймеров – 5 мин при 36 °С (праймер 1254) или 40 °С (праймер ERIC1), элонгация – 5 мин при 72 °С); 35 циклов (денатурация – 1 мин при 94 °С, отжиг праймеров – 1 мин при 36 °С (праймер 1254) или 55 °С (праймер ERIC1), элонгация – 2 мин при 72 °С и заключительная элонгация – 10 мин при 72 °С) [31; 32]. Электрофоретическое разделение продуктов ПЦР проводили в 1,5 % агарозном геле с бромистым этидием (0,5 мкг/мл) с использованием 1 х ТАЕ-буфера. При анализе профилей фрагментов ПЦР учитывали общее количество фрагментов и их размер по электрофоретической подвижности в агарозном геле. В качестве маркера молекулярного веса ДНК применяли GeneRuler™ DNA Ladder 1 Kb (*Thermo Fisher Scientific*, США). Результаты визуализировали с помощью цифровой системы документирования видеоизображения ChemiDoc MP (*BioRad*).

Результаты исследований и их обсуждение

Одним из факторов фитопатогенности бактерий является продукция ферментов, разрушающих компоненты клеточной стенки растений [34]. Поэтому при исследовании физиолого-биохимических свойств анализируемых штаммов *B. pumilus*, большинство из которых были изолированы из растений с признаками бактериоза, особое внимание уделяли ферментативной активности гидролаз. Установлено, что все исследуемые штаммы не отличаются друг от друга по большинству тестируемых признаков (табл. 2). Различия наблюдаются только по признакам целлюло- и пектолитической активности. Штаммы, выделенные из почвы, не проявляли целлюлолитической активности в отличие от штаммов, изолированных из растений (рис. 1).

Таблица 2

Физиолого-биохимические свойства исследуемых штаммов *B. pumilus*

Table 2

Physiological and biochemical properties of *B. pumilus* strains used in the study

Штамм	Наличие или характер исследуемого признака										
	Продукция оксидазы	Продукция каталазы	Образование ацетона	Продукция нитрат-редуктаз	Гидролиз крахмала	Разжижение желатина	Гидролиз казеина	Продукция липазы (твин-80)	Продукция целлюлазы	Продукция пектат-лиаз	О-Ф-тест
36.2	–	+	+	–	–	+	+	+	+	+	F
19.6	–	+	+	–	–	+	+	+	+	+	F
39.2	–	+	+	–	–	+	+	+	+	+	F
39.3	–	+	+	–	–	+	+	+	+	+	F
32.8	–	+	+	–	–	+	+	+	+	+	F
44.2	–	+	+	–	–	+	+	+	+	+	F
37.7	–	+	+	–	–	+	+	+	+	+	F
38.2	–	+	+	–	–	+	+	+	+	+	F
51.2	–	+	+	–	–	+	+	+	+	+	F
40.2	–	+	+	–	–	+	+	+	+	+	F
41.2	–	+	+	–	–	+	+	+	+	+	F
61.2	–	+	+	–	–	+	+	+	+	+	F

Окончание табл. 2
Ending table 2

Штамм	Наличие или характер исследуемого признака										
	Продукция оксидазы	Продукция каталазы	Образование ацетона	Продукция нитрат-редуктаз	Гидролиз крахмала	Разжижение желатина	Гидролиз казеина	Продукция липазы (твин-80)	Продукция целлюлазы	Продукция пектат-лиаз	О – F-тест
61.3	–	+	+	–	–	+	+	+	+	+	F
T1	–	+	+	–	–	+	+	+	+	+	F
T2	–	+	+	–	–	+	+	+	+	±	F
33.4	–	+	+	–	–	+	+	+	+	+	F
33.5	–	+	+	–	–	+	+	+	+	+	F
4Л	–	+	+	–	–	+	+	+	+	±	F
6Л	–	+	+	–	–	+	+	+	+	±	F
1MRL	–	+	+	–	–	+	+	+	+	±	F
11-1-1	–	+	+	–	–	+	+	+	+	+	F
33-3	–	+	+	–	–	+	+	+	+	+	F
21-3	–	+	+	–	–	+	+	+	+	+	F
17-2	–	+	+	–	–	+	+	+	+	+	F
6-5-2	–	+	+	–	–	+	+	+	+	+	F
63-1-3	–	+	+	–	–	+	+	+	+	+	F
63-2-2	–	+	+	–	–	+	+	+	+	+	F
65-4	–	+	+	–	–	+	+	+	+	±	F
43-3-1	–	+	+	–	–	+	+	+	+	+	F
71-4-1	–	+	+	–	–	+	+	+	+	+	F
P10	–	+	+	–	–	+	+	+	+	+	F
P107	–	+	+	–	–	+	+	+	+	+	F
P109	–	+	+	–	–	+	+	+	+	+	F
P110	–	+	+	–	–	+	+	+	+	+	F
БИМ В-171	–	+	+	–	–	+	+	+	–	+	F
БИМ В-211	–	+	+	–	–	+	+	+	–	±	F
БИМ В-369	–	+	+	–	–	+	+	+	–	–	F
БИМ В-373	–	+	+	–	–	+	+	+	–	±	F
БИМ В-394	–	+	+	–	–	+	+	+	–	+	F
БИМ В-401	–	+	+	–	–	+	+	+	–	–	F

Примечание. Знак «плюс» означает наличие признака; знак «минус» – отсутствие признака; знак «плюс/минус» – слабую выраженность признака.

Продукция пектат-лиаз выявлена у всех исследованных штаммов *B. pumilus*, за исключением кол-лекционных культур БИМ В-369 и БИМ В-401. Однако лунки на поверхности полипектатного геля формировались только на 3–4-е сутки инкубации бактерий, при этом у штаммов Т2, 65-4, БИМ В-211 и БИМ В-373 область гидролиза представляла собой узкий ореол вокруг медальона. Следует отметить, что по сравнению с некротрофными фитопатогенными бактериями *Pectobacterium carotovorum*, взятыми в наших экспериментах в качестве положительного контроля, продукция (и(или) активность) пектат-лиаз и целлюлаз у бактерий *B. pumilus* была значительно ниже (см. рис. 1, а и б).

Проверка устойчивости бактерий к неблагоприятным факторам показала, что все исследованные штаммы росли в присутствии повышенного содержания хлорида натрия (до 10 %) и при пониженной температуре (до +10 °С).



Рис. 1. Результат тестирования целлюлолитической (а) и пектолитической (б) активности штаммов *B. pumilus*

Fig. 1. Result of cellulolytic (a) and pectolytic (b) activity test of *B. pumilus* strains

Изучение структурно-функциональной организации генома бактерий позволяет выявлять тонкие генетические различия и дифференцировать штаммы, не отличающиеся по своим морфологическим и биохимическим характеристикам. В литературе есть сведения о высокой степени генетической гетерогенности вида *B. pumilus* по сравнению с близкородственными видами [37; 38]. В наших исследованиях обнаружено, что у 18 из 40 изученных штаммов присутствует как минимум одна плазмида небольшого размера (6000–8000 п. н.) высокой копийности, достаточной для визуальной детекции на электрофореграммах (рис. 2). Наличие плазмидной ДНК регистрировали в препаратах геномной ДНК штаммов Т2, 19.6, 33.4, 36.2, 37.7, 40.2, 44.2, 33-3, 43-3-1, 63-1-3, 6-5-2, 71-4-1, 63-2-2, 1МRL, изолированных из растений, и в штаммах БИМ В-171, БИМ В-373, БИМ В-394, БИМ В-401, выделенных из почвы. Эти данные согласуются с ранее опубликованными сведениями о наличии небольших плазмид у представителей рода *Bacillus* [39], однако считается, что частота распространенности внехромосомных генетических элементов у *B. pumilus* невысокая [40]. В последнее время среди грамположительных бактерий широко распространились плазмиды, несущие гены устойчивости к антибактериальным веществам [41; 42], при этом известно, что большинство мелких плазмид, характерных для представителей рода *Bacillus*, являются криптическими [43]. В экспериментах, выполненных нами, не удалось выявить фенотипических различий между плазмидсодержащими и бесплазмидными штаммами, в том числе в чувствительности к антибиотикам с различными механизмами действия.

При использовании праймера 1254 для анализа генетической гетерогенности *B. pumilus* получены 16 различных RAPD-профилей, содержащих от двух до девяти ампликонов размером от 250 до 3000 п. н. Штаммы *B. pumilus* 63-2-2, T2, 61.2, 41.2, БИМ В-369, БИМ В-394, БИМ В-211, 4Л, 6Л, 1МRL характеризовались специфическими индивидуальными профилями, остальные штаммы разделились на шесть групп по типу профиля фрагментов ДНК, полученного с помощью RAPD-ПЦР (табл. 3). В самой многочисленной

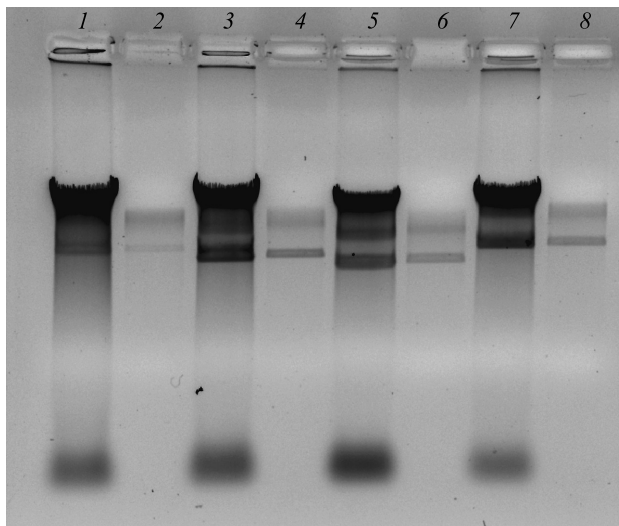


Рис. 2. Электрофореграмма препаратов геномной (1, 3, 5, 7) и плазмидной (2, 4, 6, 8) ДНК штаммов *B. pumilus*: 1, 2 – *B. pumilus* T2; 3, 4 – *B. pumilus* БИМ В-171; 5, 6 – *B. pumilus* 33-3; 7, 8 – *B. pumilus* 63-2-2

Дифференциация изолятов *B. pumilus* по профилям фрагментов ДНК,
полученным с помощью RAPD- и REP-ПЦР

B. pumilus strains differentiation by DNA fragments profiles obtained with RAPD- and REP-PCR

Профиль фрагментов ДНК, полученный с праймером 1254	Штамм	Профиль фрагментов ДНК, полученный с праймером ERIC1	Штамм
	37.7, 33.4, 19.6, 40.2, 44.2, 36.2, 6-5-2, 43-3-1, 63-1-3, 71-4-1		37.7, 33.4, 19.6, 40.2, 44.2, 36.2, 6-5-2, 43-3-1, 63-1-3, 71-4-1
	61.2		61.2, 11-1-1, 32.8, 33.5, 38.2, 39.2, 39.3, 51.2, 61.3, T1
	11-1-1, 32.8, 33.5, 38.2, 39.2, 39.3, 51.2, 61.3, T1		
	17-2, 33-3		17-2, 33-3, 41.2
	41.2		
	63-2-2		63-2-2
	21-3, 65-4		21-3, 65-4
	БИМ В-369		БИМ В-369
	БИМ В-171, БИМ В-373, БИМ В-401		БИМ В-171, БИМ В-373, БИМ В-401
	БИМ В-211		БИМ В-211
	БИМ В-394		БИМ В-394
	T2		T2
	P10, P107, P109, P110		P10, P107, P109, P110
	4Л		4Л
	6Л		6Л
	1MRL		1MRL
	Маркер молекулярного веса ДНК		Маркер молекулярного веса ДНК

группе оказалось десять штаммов, изолированных из растений огурца (36.2), томата (37.7, 33.4, 19.6, 40.2, 44.2) и клубней картофеля (6-5-2, 43-3-1, 63-1-3, 71-4-1), выращенных в территориально удаленных районах Могилёвской, Минской, Брестской и Витебской областей. REP-профили данных штаммов также идентичны. Еще одной объединяющей характеристикой послужило наличие плазмидной ДНК размером около 8000 п. н. Вторую многочисленную группу на основании полученного отличающегося RAPD-профиля составили штаммы, выделенные из растений томата (32.8, 33.5, 38.2, 39.2, 39.3, 51.2, 61.3, T1) и картофеля (11-1-1). По результатам REP-ПЦР в этой же группе оказался и штамм 61.2. По специфическим наборам фрагментов ДНК, полученным при использовании REP- и RAPD-ПЦР, в третью группу объединены изоляты из растений сосны (P10, P107, P109, P110). Четвертую группу составили почвенные штаммы БИМ В-171, БИМ В-373, БИМ В-401. Штаммы 21-3, 65-4 и 17-2, 33-3, изолированные из клубней картофеля, образовали пятую и шестую группы. Кроме того, по результатам REP-ПЦР в шестую группу попал штамм 41.2, выделенный из растений томата. Некоторые типы профилей имели схожий набор фрагментов и отличались только наличием или отсутствием одной-двух полос на электрофореграмме (например, профили БИМ В-211 и БИМ В-369). Другие имели значительные различия в количестве и размере фрагментов, тем не менее ни в одной группе не оказались вместе штаммы, выделенные из растений и почвы. В целом дифференциация штаммов по профилям фрагментов ДНК, полученным методами RAPD- и REP-ПЦР, совпала, за исключением штаммов *B. pumilus* 61.2 и 41.2, REP-профили которых были не уникальны и попали в две различные группы, определенные ранее с помощью RAPD-ПЦР. Результаты осуществленного нами типирования подтверждают опубликованные другими авторами сведения о высокой степени генетической гетерогенности бактерий *B. pumilus* и позволяют отбирать штаммы, отличающиеся структурной организацией геномов, для дальнейшего детального молекулярно-генетического анализа.

Заключение

В результате проведенных исследований установлено, что бактерии *B. pumilus*, изолированные из различных источников на территории Беларуси, фенотипически представляют собой довольно однородную группу. Для всех 40 протестированных штаммов характерно наличие ряда гидролаз, однако почвенные штаммы отличаются от изолятов из растений отсутствием целлюлолитической активности, а штаммы БИМ В-369 и БИМ В-401 – отсутствием продукции пектат-лиаз. Применение молекулярных методов RAPD- и ERIC-ПЦР выявило высокую степень генетической гетерогенности исследованных бактерий. Дифференцирующая способность RAPD-ПЦР с использованием праймера 1254 оказалась выше, чем REP-ПЦР с праймером ERIC1 для выявления генетических различий штаммов *B. pumilus*. Дифференциация изолятов *B. pumilus* по профилю полученных ампликонов RAPD- и REP-ПЦР показала, что сходство или различие в некоторой степени связано с источником выделения бактерий.

Библиографические ссылки

1. Huang Q., Peng Y., Li X., et al. Purification and characterization of an extracellular alkaline serine protease with dehairing function from *Bacillus pumilus* // Curr. Microbiol. 2003. Vol. 46, issue 3. P. 169–173. DOI: 10.1007/s00284-002-3850-2.
2. Asha Poorna C., Prema P. Production of cellulase-free endoxylanase from novel alkalophilic thermotolerant *Bacillus pumilus* by solid-state fermentation and its application in wastepaper recycling // Biores. Technol. 2006. Vol. 98, issue 3. P. 485–490. DOI: 10.1016/j.biortech.2006.02.033.
3. Balasubramanian N., Simões N. *Bacillus pumilus* S124A carboxymethyl cellulase; a thermo stable enzyme with a wide substrate spectrum utility // Int. J. Biol. Macromol. 2014. Vol. 67. P. 132–139. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2014.03.014.
4. Zang H., Xie S., Wu H. A novel thermostable GH5_7 β -mannanase from *Bacillus pumilus* GBSW19 and its application in manno-oligosaccharides (MOS) production // Enzyme Microb. Technol. 2015. Vol. 78. P. 1–9. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2015.06.007.
5. Guan Z.-B., Shui Y., Song C. M., et al. Efficient secretory production of CotA-laccase and its application in the decolorization and detoxification of industrial textile wastewater // Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 2015. Vol. 22, issue 12. P. 9515–9523. DOI: 10.1007/s11356-015-4426-6.
6. Aunpad R., Na-Bangchang K. Pumilicin 4, a novel bacteriocin with anti-MRSA and anti-VRE activity produced by newly isolated bacteria *Bacillus pumilus* strain WAPB4 // Curr. Microbiol. 2007. Vol. 55, issue 4. P. 308–313. DOI: 10.1007/s00284-006-0632-2.
7. Brack C., Mikolasch A., Schlueter R., et al. Antibacterial metabolites and bacteriolytic enzymes produced by *Bacillus pumilus* during bacteriolysis of *Arthrobacter citreus* // Mar. Biotechnol. 2015. Vol. 17, issue 3. P. 290–304. DOI: 10.1007/s10126-015-9614-3.
8. De-Bashan L. E., Hernandez J. P., Bashan Y., et al. *Bacillus pumilus* ES4: candidate plant growth-promoting bacterium to enhance establishment of plants in mine tailings // Environ. Exp. Bot. 2010. Vol. 69, issue 3. P. 343–352. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2010.04.014.
9. Kuan K. B., Othman R., Abdul Rahim K., et al. Plant growth-promoting rhizobacteria inoculation to enhance vegetative growth, nitrogen fixation and nitrogen remobilisation of Maize under greenhouse conditions // PLoS ONE. 2016. Vol. 11, issue 3. P. 1–19. DOI: 10.1371/journal.pone.0152478.

10. Gutiérrez-Mañero F. J., Ramos-Solano B., Probanza A., et al. The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins // *Physiol. Plant.* 2001. Vol. 111, issue 2. P. 206–211. DOI: 10.1034/j.1399-3054.2001.1110211.x.
11. Bentur H. N., Dalzell A., Riordan F. A. I. Central venous catheter infection with *Bacillus pumilus* in an immunocompetent child: a case report // *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 2007. Vol. 6. P. 12. DOI: 10.1186/1476-0711-6-12.
12. Hernaiz C., Picardo A., Alos J. I., et al. Nosocomial bacteremia and catheter infection by *Bacillus cereus* in an immunocompetent patient // *Clin. Microbiol. Infect.* 2003. Vol. 9, issue 9. P. 973–975. DOI: 10.1046/j.1469-0691.2003.00682.x.
13. Kimouli M., Vrioni G., Papadopoulou M., et al. Two cases of severe sepsis caused by *Bacillus pumilus* in neonatal infants // *J. Med. Microbiol.* 2012. Vol. 61. P. 596–599. DOI: 10.1099/jmm.0.033175-0.
14. From C., Hormazabal V., Granum P. E. Food poisoning associated with pumilacidin-producing *Bacillus pumilus* in rice // *Int. J. Food Microbiol.* 2007. Vol. 115, issue 3. P. 319–324. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.11.005.
15. Grass G., Bierbaum G., Molitor E., et al. Genome sequence of *Bacillus pumilus* strain bonn, isolated from an anthrax-like necrotic skin infection site of a child // *Genome Announc.* 2016. Vol. 4, issue 1. Article ID: e01741-15. DOI: 10.1128/genomeA.01741-15.
16. Galal A. A., El-Bana A. A., Janse J. *Bacillus pumilus*, a new pathogen on Mango plants // *Egypt. J. Phytopathol.* 2006. Vol. 34, № 1. P. 17–29.
17. Bathily H., Babana A. H., Samaké F. *Bacillus pumilus* a new pathogen on potato tubers in storage in Mali // *Afr. J. Microbiol. Res.* 2010. Vol. 4, issue 20. P. 2067–2071.
18. Peng Q., Yuan Y., Gao M. *Bacillus pumilus*, a novel ginger rhizome rot pathogen in China // *Plant Dis.* 2013. Vol. 97, № 10. P. 1308–1315. DOI: 10.1094/PDIS-12-12-1178-RE.
19. Li B., Qiu W., Tan Q. M., et al. Association of a bacillus species with leaf and twig dieback of Asian pear (*Pyrus pyrifolia*) in China // *J. Plant Pathol.* 2009. Vol. 91, № 3. P. 705–708. DOI: 10.4454/jpp.v91i3.565.
20. Font M. I., Bassimba D. D. M., Cebrián M. C., et al. First report of *Bacillus pumilus* on *Phaseolus vulgaris* in Spain // *Plant Pathol.* 2010. Vol. 59, issue 2. P. 400. DOI: 10.1111/j.1365-3059.2009.02172.x.
21. Kotan R., Sahin F., Ala A. Identification and pathogenicity of bacteria isolated from pome fruit trees in the Eastern Anatolia region of Turkey // *J. Plant Dis. Prot.* 2006. Vol. 113, № 1. P. 8–13.
22. Mikiciński A., Pulawska J., Sobiczewski P., et al. Pectolytic bacteria associated with soft rot of dieffenbachia (*Dieffenbachia maculata*) // *Phytopathologia.* 2010. Vol. 58. P. 21–32.
23. Комар Е. И., Песнякевич А. Г. Характеристика возбудителей бактериальных гнилей картофеля на территории Беларуси // *Вестн. БГУ. Сер. 2, Химия. Биология. География.* 2013. № 1. С. 78–82.
24. Kovaleva V. A., Shalovylo Y. I., Gorovik Y. N., et al. *Bacillus pumilus* – a new phytopathogen of Scots pine – Short Communication // *J. For. Sci.* 2015. Vol. 61, № 3. P. 131–137.
25. Mel S. F., Mekalanos J. J. Modulation of horizontal gene transfer in pathogenic bacteria by *in vivo* signals // *Cell.* 1996. Vol. 87, issue 5. P. 795–798. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)81986-8.
26. Garcia-Vallvé S., Romeu A., Palau J. Horizontal gene transfer in bacterial and archaeal complete genomes // *Genome Res.* 2000. Vol. 10. P. 1719–1725. DOI: 10.1101/gr.130000.
27. Parvathi A., Krishna K., Jose J., et al. Biochemical and molecular characterization of *Bacillus pumilus* isolated from coastal environment in Cochin, India // *Braz. J. Microbiol.* 2009. Vol. 40, issue 2. P. 269–275. DOI: 10.1590/S1517-838220090002000012.
28. Rasko D. A., Rosovitz M. J., Økstad O. A., et al. Complete sequence analysis of novel plasmids from emetic and periodontal *Bacillus cereus* isolates reveals a common evolutionary history among the *B. cereus*-group plasmids, including *Bacillus anthracis* pXO1 // *J. Bacteriol.* 2007. Vol. 189, № 1. P. 52–64. DOI: 10.1128/JB.01313-06.
29. Gabr M. R., Gazar A. A. Gabbage head rot due to sporeforming bacteria [*Bacillus polymyxa* and *Bacillus pumilus*; Egypt] // *Ann. Agric. Sci.* 2012. Vol. 28. P. 1163–1185.
30. Saleh O. I., Huang P.-Y., Huang J.-S. *Bacillus pumilus*, the cause of bacterial blotch of immature balady peach in Egypt // *J. Phytopathol.* 1997. Vol. 145. P. 447–453. DOI: 10.1111/j.1439-0434.1997.tb00348.x.
31. Shangkuan Y. H., Yang J.-F., Lin H.-C., et al. Comparison of PCR-RFLP, ribotyping and ERIC-PCR for typing *Bacillus anthracis* and *Bacillus cereus* strains // *J. Appl. Microbiol.* 2000. Vol. 89, issue 3. P. 452–462. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2000.01134.x.
32. Akopyanz N., Bukanov N. O., Westblom T. U., et al. DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR-based RAPD fingerprinting // *Nucleic Acids Res.* 1992. Vol. 20, № 19. P. 5137–5142.
33. Евдокимова О. В., Мямин В. Е., Валентович Л. Н. Идентификация бактерий *Bacillus pumilus* с помощью видоспецифичной ПЦР // *Молекулярная и прикладная генетика : сб. науч. тр.* 2016. Т. 21. С. 53–63.
34. Желдакова Р. А., Мямин В. Е. Фитопатогенные микроорганизмы. Минск : БГУ, 2006.
35. Непрусов А. И., Егорова М. А., Захарчук Л. М. и др. Практикум по микробиологии. М. : Академия, 2005.
36. Wilson K. Preparation of genomic DNA from bacteria // *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 2001. P. 2.4.1–2.4.5. DOI: 10.1002/0471142727.mb0204s56.
37. Wulff E. G., Mguni C. M., Mansfeld-Giese K., et al. Biochemical and molecular characterization of *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. subtilis* and *B. pumilus* isolates with distinct antagonistic potential against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* // *Plant Pathol.* 2002. Vol. 51, issue 5. P. 574–584. DOI: 10.1046/j.1365-3059.2002.00753.x.
38. De Jonghe V., Coorevits A., Vandroemme J., et al. Intrasppecific genotypic diversity of *Bacillus* species from raw milk // *Int. Dairy J.* 2008. Vol. 18, № 5. P. 496–505. DOI: 10.1016/j.idairyj.2007.11.007.
39. Guglielmetti S., Mora D., Parini C. Small rolling circle plasmids in *Bacillus subtilis* and related species: Organization, distribution, and their possible role in host physiology // *Plasmid.* 2007. Vol. 57, № 3. P. 245–264. DOI: 10.1016/j.plasmid.2006.09.002.
40. Garcia-Ramon D. C., Luque-Navas M. J., Molina C. A., et al. Identification, sequencing and comparative analysis of pBp15.S plasmid from the newly described entomopathogen *Bacillus pumilus* 15.1 // *Plasmid.* 2015. Vol. 82. P. 17–27. DOI: 10.1016/j.plasmid.2015.09.001.
41. Schwarz S., Shen J., Wendlandt S., et al. Plasmid-mediated antimicrobial resistance in *Staphylococci* and other Firmicutes // *Microbiol. Spectr.* 2014. Vol. 2, issue 6. P. 421–444. DOI: 10.1128/microbiolspec.PLAS-0020-2014.
42. Lanza V. F., Tedim A. P., Martinez J. L., et al. The plasmidome of Firmicutes: impact on the emergence and the spread of resistance to antimicrobials // *Microbiol. Spectr.* 2015. Vol. 3, № 2. P. 1–37. DOI: 10.1128/microbiolspec.PLAS-0039-2014.
43. Тумок М. А. Плазмиды грамположительных бактерий. Минск : БГУ, 2004.

References

1. Huang Q., Peng Y., Li X., et al. Purification and characterization of an extracellular alkaline serine protease with dehairing function from *Bacillus pumilus*. *Curr. Microbiol.* 2003. Vol. 46, issue 3. P. 169–173. DOI: 10.1007/s00284-002-3850-2.
2. Asha Poorna C., Prema P. Production of cellulase-free endoxylanase from novel alkalophilic thermotolerant *Bacillus pumilus* by solid-state fermentation and its application in wastepaper recycling. *Biores. Technol.* 2006. Vol. 98, issue 3. P. 485–490. DOI: 10.1016/j.biortech.2006.02.033.
3. Balasubramanian N., Simões N. *Bacillus pumilus* S124A carboxymethyl cellulase; a thermo stable enzyme with a wide substrate spectrum utility. *Int. J. Biol. Macromol.* 2014. Vol. 67. P. 132–139. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2014.03.014.
4. Zang H., Xie S., Wu H. A novel thermostable GH5 7 β -mannanase from *Bacillus pumilus* GBSW19 and its application in manno-oligosaccharides (MOS) production. *Enzyme Microb. Technol.* 2015. Vol. 78. P. 1–9. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2015.06.007.
5. Guan Z.-B., Shui Y., Song C. M., et al. Efficient secretory production of CotA-laccase and its application in the decolorization and detoxification of industrial textile wastewater. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 2015. Vol. 22, issue 12. P. 9515–9523. DOI: 10.1007/s11356-015-4426-6.
6. Aunpad R., Na-Bangchang K. Pumilicin 4, a novel bacteriocin with anti-MRSA and anti-VRE activity produced by newly isolated bacteria *Bacillus pumilus* strain WAPB4. *Curr. Microbiol.* 2007. Vol. 55, issue 4. P. 308–313. DOI: 10.1007/s00284-006-0632-2.
7. Brack C., Mikolasch A., Schlueter R., et al. Antibacterial metabolites and bacteriolytic enzymes produced by *Bacillus pumilus* during bacteriolysis of *Arthrobacter citreus*. *Mar. Biotechnol.* 2015. Vol. 17, issue 3. P. 290–304. DOI: 10.1007/s10126-015-9614-3.
8. De-Bashan L. E., Hernandez J. P., Bashan Y., et al. *Bacillus pumilus* ES4: candidate plant growth-promoting bacterium to enhance establishment of plants in mine tailings. *Environ. Exp. Bot.* 2010. Vol. 69, issue 3. P. 343–352. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2010.04.014.
9. Kuan K. B., Othman R., Abdul Rahim K., et al. Plant growth-promoting rhizobacteria inoculation to enhance vegetative growth, nitrogen fixation and nitrogen remobilisation of Maize under greenhouse conditions. *PLoS ONE*. 2016. Vol. 11, issue 3. P. 1–19. DOI: 10.1371/journal.pone.0152478.
10. Gutiérrez-Mañero F. J., Ramos-Solano B., Probanza A., et al. The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. *Physiol. Plant.* 2001. Vol. 111, issue 2. P. 206–211. DOI: 10.1034/j.1399-3054.2001.1110211.x.
11. Bentur H. N., Dalzell A., Riordan F. A. I. Central venous catheter infection with *Bacillus pumilus* in an immunocompetent child: a case report. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 2007. Vol. 6. P. 12. DOI: 10.1186/1476-0711-6-12.
12. Hernaiz C., Picardo A., Alos J. I., et al. Nosocomial bacteremia and catheter infection by *Bacillus cereus* in an immunocompetent patient. *Clin. Microbiol. Infect.* 2003. Vol. 9, issue 9. P. 973–975. DOI: 10.1046/j.1469-0691.2003.00682.x.
13. Kimouli M., Vrioni G., Papadopolou M., et al. Two cases of severe sepsis caused by *Bacillus pumilus* in neonatal infants. *J. Med. Microbiol.* 2012. Vol. 61. P. 596–599. DOI: 10.1099/jmm.0.033175-0.
14. From C., Hormazabal V., Granum P. E. Food poisoning associated with pumilacin-producing *Bacillus pumilus* in rice. *Int. J. Food Microbiol.* 2007. Vol. 115, issue 3. P. 319–324. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.11.005.
15. Grass G., Bierbaum G., Molitor E., et al. Genome sequence of *Bacillus pumilus* strain bonn, isolated from an anthrax-like necrotic skin infection site of a child. *Genome Announc.* 2016. Vol. 4, issue 1. Article ID: e01741-15. DOI: 10.1128/genomeA.01741-15.
16. Galal A. A., El-Bana A. A., Janse J. *Bacillus pumilus*, a new pathogen on Mango plants. *Egypt. J. Phytopathol.* 2006. Vol. 34, No. 1. P. 17–29.
17. Bathily H., Babana A. H., Samaké F. *Bacillus pumilus* a new pathogen on potato tubers in storage in Mali. *Afr. J. Microbiol. Res.* 2010. Vol. 4, issue 20. P. 2067–2071.
18. Peng Q., Yuan Y., Gao M. *Bacillus pumilus*, a novel ginger rhizome rot pathogen in China. *Plant Dis.* 2013. Vol. 97, No. 10. P. 1308–1315. DOI: 10.1094/PDIS-12-12-1178-RE.
19. Li B., Qiu W., Tan Q. M., et al. Association of a bacillus species with leaf and twig dieback of Asian pear (*Pyrus pyrifolia*) in China. *J. Plant Pathol.* 2009. Vol. 91, No. 3. P. 705–708. DOI: 10.4454/jpp.v91i3.565.
20. Font M. I., Bassimba D. D. M., Cebrián M. C., et al. First report of *Bacillus pumilus* on *Phaseolus vulgaris* in Spain. *Plant Pathol.* 2010. Vol. 59, issue 2. P. 400. DOI: 10.1111/j.1365-3059.2009.02172.x.
21. Kotan R., Sahin F., Ala A. Identification and pathogenicity of bacteria isolated from pome fruit trees in the Eastern Anatolia region of Turkey. *J. Plant Dis. Prot.* 2006. Vol. 113, No. 1. P. 8–13.
22. Mikiciński A., Pulawska J., Sobiczewski P., et al. Pectolytic bacteria associated with soft rot of dieffenbachia (*Dieffenbachia maculata*). *Phytopathologia*. 2010. Vol. 58. P. 21–32.
23. Komar E. I., Pesnyakevich A. G. Characterisation of bacteria cause soft rot potato in Belarus. *Vestnik BSU. Ser. 2, Chem. Biol. Geogr.* 2013. No. 1. P. 78–82 (in Russ.).
24. Kovaleva V. A., Shalovylo Y. I., Gorovik Y. N., et al. *Bacillus pumilus* – a new phytopathogen of Scots pine – Short Communication. *J. For. Sci.* 2015. Vol. 61, No. 3. P. 131–137.
25. Mel S. F., Mekalanos J. J. Modulation of horizontal gene transfer in pathogenic bacteria by *in vivo* signals. *Cell*. 1996. Vol. 87, issue 5. P. 795–798. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)81986-8.
26. Garcia-Vallvé S., Romeu A., Palau J. Horizontal gene transfer in bacterial and archaeal complete genomes. *Genome Res.* 2000. Vol. 10. P. 1719–1725. DOI: 10.1101/gr.130000.
27. Parvathi A., Krishna K., Jose J., et al. Biochemical and molecular characterization of *Bacillus pumilus* isolated from coastal environment in Cochin, India. *Braz. J. Microbiol.* 2009. Vol. 40, issue 2. P. 269–275. DOI: 10.1590/S1517-838220090002000012.
28. Rasko D. A., Rosovitz M. J., Økstad O. A., et al. Complete sequence analysis of novel plasmids from emetic and periodontal *Bacillus cereus* isolates reveals a common evolutionary history among the *B. cereus*-group plasmids, including *Bacillus anthracis* pXO1. *J. Bacteriol.* 2007. Vol. 189, No. 1. P. 52–64. DOI: 10.1128/JB.01313-06.
29. Gabr M. R., Gazar A. A. Gabbage head rot due to sporeforming bacteria [*Bacillus polymyxa* and *Bacillus pumilus*; Egypt]. *Ann. Agric. Sci.* 2012. Vol. 28. P. 1163–1185.
30. Saleh O. I., Huang P.-Y., Huang J.-S. *Bacillus pumilus*, the cause of bacterial blotch of immature balady peach in Egypt. *J. Phytopathol.* 1997. Vol. 145. P. 447–453. DOI: 10.1111/j.1439-0434.1997.tb00348.x.
31. Shangkuan Y. H., Yang J.-F., Lin H.-C., et al. Comparison of PCR-RFLP, ribotyping and ERIC-PCR for typing *Bacillus anthracis* and *Bacillus cereus* strains. *J. Appl. Microbiol.* 2000. Vol. 89, issue 3. P. 452–462. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2000.01134.x.

32. Akopyanz N., Bukanov N. O., Westblom T. U., et al. DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR-based RAPD fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 1992. Vol. 20, No. 19. P. 5137–5142.
33. Yeudakimava O. V., Miamin V. E., Valentovich L. N. Identification of *Bacillus pumilus* bacteria by using species-specific PCR assay. *Molecular and Applied Genetics* : proceedings. 2016. Vol. 21. P. 53–63 (in Russ.).
34. Zheldakova R. A., Miamin V. E. [Phytopathogenic microorganisms]. Minsk : BSU, 2006 (in Russ.).
35. Netrusov A. I., Egorova M. A., Zakharchuk L. M., et al. [Practical Microbiology]. Moscow : Akademiya, 2005 (in Russ.).
36. Wilson K. Preparation of genomic DNA from bacteria. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 2001. P. 2.4.1–2.4.5. DOI: 10.1002/0471142727.mb0204s56.
37. Wulff E. G., Mguni C. M., Mansfeld-Giese K., et al. Biochemical and molecular characterization of *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. subtilis* and *B. pumilus* isolates with distinct antagonistic potential against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Plant Pathol.* 2002. Vol. 51, issue 5. P. 574–584. DOI: 10.1046/j.1365-3059.2002.00753.x.
38. De Jonghe V., Coorevits A., Vandroemme J., et al. Intraspecific genotypic diversity of *Bacillus species* from raw milk. *Int. Dairy J.* 2008. Vol. 18, No. 5. P. 496–505. DOI: 10.1016/j.idairyj.2007.11.007.
39. Guglielmetti S., Mora D., Parini C. Small rolling circle plasmids in *Bacillus subtilis* and related species: Organization, distribution, and their possible role in host physiology. *Plasmid.* 2007. Vol. 57, No. 3. P. 245–264. DOI: 10.1016/j.plasmid.2006.09.002.
40. Garcia-Ramon D. C., Luque-Navas M. J., Molina C. A., et al. Identification, sequencing and comparative analysis of pBp15.S plasmid from the newly described entomopathogen *Bacillus pumilus* 15.1. *Plasmid.* 2015. Vol. 82. P. 17–27. DOI: 10.1016/j.plasmid.2015.09.001.
41. Schwarz S., Shen J., Wendlandt S., et al. Plasmid-mediated antimicrobial resistance in *Staphylococci* and other Firmicutes. *Microbiol. Spectr.* 2014. Vol. 2, issue 6. P. 421–444. DOI: 10.1128/microbiolspec.PLAS-0020-2014.
42. Lanza V. F., Tedim A. P., Martinez J. L., et al. The plasmidome of Firmicutes: impact on the emergence and the spread of resistance to antimicrobials. *Microbiol. Spectr.* 2015. Vol. 3, No. 2. P. 1–37. DOI: 10.1128/microbiolspec.PLAS-0039-2014.
43. Titok M. A. [Plasmids of gram-positive bacteria]. Minsk : BSU, 2004 (in Russ.).

Статья поступила в редколлегию 22.12.2017.
Received by editorial board 22.12.2017.