

**О.О. Нечипуренко, М.А. Хархота, Л.Б. Зелена,  
А.М. Остапчук, Л.В. Авдєєва**

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

## **ПОЛІФАЗНИЙ ТАКСОНОМІЧНИЙ АНАЛІЗ КАРОТИНСИНТЕЗУВАЛЬНОГО ШТАМУ *BACILLUS* SP. 1.1, ПЕРСПЕКТИВНОГО ДЛЯ СТВОРЕННЯ ПРОБІОТИКА**

*Проведено поліфазний таксономічний аналіз каротинсинтезувального штаму *Bacillus sp. 1.1*, перспективного для створення пробіотику. На основі культурально-морфологічних та фізіолого-біохімічних ознак досліджуваній штаму віднесено до виду *Bacillus subtilis*. Однак, жирнокислотний профіль клітинних стінок штаму представлений переважно розгалуженими похідними ізо- та антіізо- C15:0 і C17:0 сполук (понад 70 %), що характерно для виду *Bacillus amyloliquefaciens*. На основі нуклеотидної послідовності гена 16S рРНК, а також профілю поліморфних нуклеотидів штаму віднесено до виду *Bacillus amyloliquefaciens*.*

*Ключові слова:* штаму *Bacillus sp.*, поліфазний таксономічний аналіз

На сьогодні у світі серед різних систематичних груп мікроорганізмів, зокрема бактерій роду *Bacillus*, широко проводиться пошук нових пробіотичних штамів, що більш ефективні за існуючі [5]. Головними напрямками вирішення цієї проблеми є розробка препаратів на основі декількох штамів бактерій (біоспорин), що за своїми біологічними властивостями доповнюють один одного, створення генномодифікованих штамів з визначеними властивостями (субалін), використання у складі пробіотичних препаратів пребіотиків тощо [5, 12]. Наразі відомо, що деякі штами бактерій роду *Bacillus* одночасно характеризуються пробіотичними властивостями і синтезують пігменти каротиноїдної природи [14]. У попередніх роботах нами було показано, що вищевказані особливості притаманні штаму *Bacillus sp. 1.1* [1, 2].

Однією з вимог до пробіотичних штамів є коректна їх ідентифікація [3, 5]. Складність при ідентифікації бактерій роду *Bacillus* полягає у відсутності чітких відмінностей між видами за фенотиповими ознаками. Крім того, з розвитком молекулярно-генетичних методів досліджень, систематика бацил істотно змінилася [7].

З огляду на вищевикладене, метою роботи було ідентифікувати каротинсинтезувальний штаму *Bacillus sp. 1.1* за допомогою поліфазного таксономічного аналізу, що об'єднує біохімічну ідентифікацію, встановлення жирнокислотного складу ліпідів клітинної стінки та визначення нуклеотидної послідовності гена 16S рРНК бактерій.

**Матеріали та методи роботи.** Об'єктом дослідження були каротинсинтезувальні штами *Bacillus sp. 1.1* та *B. amyloliquefaciens* IMB В-7525 з колекції культур відділу антибіотиків Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного (ІМВ) НАН України. Останній був використаний в

якості порівняння. Культурально-морфологічні особливості бактерій вивчали за їх культивування протягом 18–24 годин при температурі 37 °С на м'ясо-пептонному агарі (МПА), триптон-соєвому агарі (ТСА), м'ясо-пептонному бульйоні (МПБ).

*Визначення фізіолого-біохімічних властивостей* штамів *Bacillus* sp. 1.1 та *B. amyloliquefaciens* IMB B-7525 здійснювали відповідно до методичних рекомендацій з виділення та ідентифікації бактерій роду *Bacillus* [4, 6, 10]. Для ідентифікації штамів користувалися програмою Identax. Було проведено наступну серію тестів: оксидазну реакцію, тест Фогеса-Проскауера; визначення довжини бактеріальних клітин, форми спор; здатність гідролізувати ескулін, казеїн, крохмаль, розкласти сечовину, зброджувати целобіозу, фруктозу, галактозу, лактозу, манозу, рафінозу, салицин, ксилозу; утилізувати цитрат, сукцинат; рости за температури 50 °С, у присутності 10 % NaCl, відновлювати нітрат [11].

*Жирнокислотний склад* клітинних ліпідів вивчали методом хромато-мас-спектрометрії на приладі Agilent 6890N/5973inert (Agilent Technologies, USA), колонка капілярна HP-5MS (30м×0,25мм×0,25мкм) (J & W Scientific, USA). Розділення проводили за градієнтом температури 4 °С/хв від 150 до 250 °С, газ-носії – гелій, швидкість потоку колонки 1 мл/хв. Ідентифікацію метилових ефірів жирних кислот проводили з використанням бібліотек мас-спектрів NIST02 і стандартної суміші метилових ефірів жирних кислот бактерій (4708-U Supelco, USA) [16].

Для отримання метилових ефірів жирних кислот до промитої фізіологічним розчином добової культури додавали 2 % розчин хлористого ацетилу в метанолі і витримували при 80 °С протягом 2 годин. Метиллові ефіри тричі екстрагували гептаном і упарювали до 200 мкл [16].

*Визначення та 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 використанням набору реактивів «BigDye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit». Первинний порівняльний аналіз секвенованої послідовності проводили за допомогою програми NCBI Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Філогенетичний аналіз і порівняння нуклеотидних послідовностей фрагмента гена 16S рРНК представників різних видів роду *Bacillus* здійснювали, як описано в роботі [15]. 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 [17]. Послідовності гена 16S рРНК типових культур бактерій роду *Bacillus* були взяті з бази даних GenBank та web-ресурсу [www.straininfo.net](http://www.straininfo.net).

**Результати та їх обговорення.** У результаті дослідження культуральних, морфологічних, фізіологічних і біохімічних властивостей штаму *Bacillus* sp. 1.1 встановлено, що за його культивування на МПА, ТСА утворювалися колонії жовто-гарячого кольору діаметром близько 5–7 мм, неправильної форми, з опуклим профілем, хвилястим краєм, однорідної структури і щільної консистенції.

У фарбованих за Грамом препаратах 18–24-годинної культури відмічено поодинокі або розташовані короткими ланцюжками грам-позитивні

клітини (2,5x0,4 мкм) з центральними ендоспорами, що не роздувають клітини. На МПБ культура утворює плівку. Ферментує глюкозу, фруктозу, арабінозу, саліцин, ксилозу, целобіозу з утворенням кислоти, однак на відміну від бактерій *B. subtilis* не ферментує рафінозу, галактозу та лактозу. Культура дає позитивну реакцію Фогес-Проскауера, гідролізує ескулін, крохмаль, казеїн, желатин, утилізує сукцинат, не використовує цитрат. Не росте при 10 % NaCl та за температури 50 °С, не утворює газ з NO<sub>3</sub> в анаеробних умовах. Каталазна та оксидазна реакції позитивні. Біохімічні властивості штаму *Bacillus* sp. 1.1 та типових штамів *B. subtilis* ATCC 23857, *B. amyloliquefaciens* DSM7 наведені у таблиці 1.

**Таблиця 1.**

**Фенотипові властивості штаму *Bacillus* sp. 1.1 та типових представників видів *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* [8]**

Фізіолого-біохімічна характеристика		<i>Bacillus</i> sp. 1.1	<i>B. subtilis</i> ATCC 23857	<i>B. amyloliquefaciens</i> DSM7
Ріст	аеробний	+	+	+
	анаеробний	+/-	-	-
Реакція Фогес-Проскауера		+	+	+
Редукція нітратів		-	+	+
Гідроліз	крохмалю	+	+	+
	казеїну	+	+	+
	ескуліну	+	+	+
	желатину	+	+	+
Утилізація	цитрагу	-	+	+
	сукцинату	+	+	+
Наявність	уреази	-	н	н
	каталази	+	+	+
Ріст за концентрації NaCl у середовищі	2%	+	+	+
	5%	+	+	+
	7%	+	+	н
	10%	-	в	в
Ріст за температури, °С	20	+	+	+
	30	+	+	+
	40	+	+	+
	50	-	+	+
Кислотоутворення на середовищі з	глюкозою	+	+	+
	фруктозою	+	+	+
	галактозою	-	+	-
	лактозою	-	+	-
	манозою	+	+	в
	рафінозою	-	+	+
	саліцином	+	+	+
	ксилозою	+	+	в
	целобіозою	+	+	+

**Примітка:** «+» – наявність ознаки, «-» – відсутність ознаки, «+/-» – слабкий ріст, в – ознака варіабельна, н – інформація не представлена

Таким чином, за наведеними вище ознаками ідентифікувати штамп з точністю до 95,00 % нам не вдалося. Найбільш близьким видом до досліджуваного штаму *Bacillus* sp. 1.1 з 66,17 % подібністю був *B. subtilis* subsp. *subtilis*. Встановлена 21,75 % подібність досліджуваного штаму до *B. amyloliquefaciens*, 7,74 % – *B. pumilis* та 3,60 % – *B. cereus*. Незважаючи на близькість ізоляту *Bacillus* sp. 1.1 до виду *B. subtilis* subsp. *subtilis*, відмічено, що він характеризується декількома нетиповими для останнього біохімічними ознаками, а саме не зброджує рафінозу, не утилізує цитрат та не росте за температури 50 °С. Вищевказані характеристики притаманні 87,00 % штамів даного виду. Однак, необхідно враховувати, що культури *B. subtilis* характеризуються широкою різноманітністю біохімічних ознак, а також штамоспецифічністю. Наприклад, серед бактерій *B. subtilis* відокремлено новий вид *B. amyloliquefaciens*, хоча різниця між ними на фізіолого-біохімічному та навіть на молекулярно-генетичному рівнях незначна [7, 15].

Якісний і кількісний склад жирних кислот клітинної стінки бактерій є важливою таксономічною ознакою, що широко використовується при ідентифікації. Вміст жирних кислот штаму *Bacillus* sp. 1.1 та контрольних штамів *B. amyloliquefaciens* IMB B-7525 та *B. subtilis* CCUG 10779 наведено у таблиці 2.

Встановлено, що штами *Bacillus* sp. 1.1 і *B. amyloliquefaciens* IMB B-7525 характеризувалися наявністю в клітинній стінці значної кількості розгалужених жирних кислот (ізо- та антиізо- C<sub>15</sub> та C<sub>17</sub>), сумарна кількість яких складала близько 79 %. Виявлена властивість є характерною для бактерій роду *Bacillus* [16]. До того ж у обох культур було зареєстровано наявність близько 10 % C<sub>16</sub> жирних кислот, кількість C<sub>17</sub> майже не відрізнялася. Слід зазначити, що C<sub>18,2</sub> жирні кислоти у клітинній стінці штаму *B. amyloliquefaciens* IMB B-7525 відсутні, однак кількість C<sub>18</sub> спо-

**Таблиця 2.**

**Жирнокислотний склад клітинної стінки бактерій роду *Bacillus***

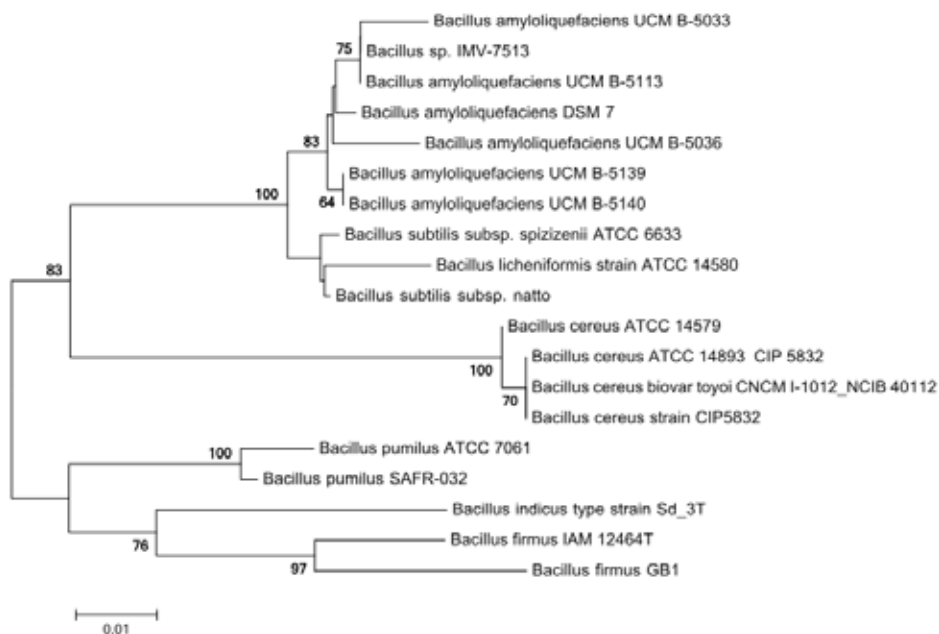
Жирні кислоти	Вміст жирних кислот штамів, %		
	<i>Bacillus</i> sp. 1.1	<i>B. amyloliquefaciens</i> IMB B-7525	<i>B. subtilis</i> CCUG 10779
ai- або iC <sub>14</sub>	1,43	0,42	1,6
iC <sub>15:0</sub>	13,22	6,25	20,6
aiC <sub>15:0</sub>	31,47	29,4	44,1 0
C <sub>15</sub>	0,11	0	0
iC <sub>16:0</sub>	6,13	4,12	2,4
C <sub>16</sub>	9,96	9,90	5,7
iC <sub>17:0</sub>	18,17	19,60	10,9
aiC <sub>17</sub>	16,27	24,00	15,8
C <sub>17</sub>	0,15	0,17	0
C <sub>18,2</sub>	0,24	0	0
C <sub>18</sub>	1,70	4,54	0

**Примітка:** *B. subtilis* CCUG 10779 (дані отримані з веб-ресурсу [www.ccug.se](http://www.ccug.se))

луку 3 рази перевищувала кількість, притаманну культурі *Bacillus* sp. 1.1. Отримані дані вказують на подібність за жирнокислотним складом штаму *Bacillus* sp. 1.1 до *B. amyloliquefaciens* IMB B-7525, а тому й можливу належність до виду *B. amyloliquefaciens*. Якісний склад жирних кислот штаму *Bacillus* sp. 1.1 також виявився характерним для бактерій групи *B. subtilis*. Однак відомо, що кількісне співвідношення різних типів жирних кислот може змінюватися залежно від середовища та умов культивування [9]. Це спонукало нас до подальшого пошуку ознак, за якими можна з високим рівнем вірогідності визначити видову належність досліджуваного штаму.

На сьогодні вважається, що найбільш точним методом ідентифікації бактерій є сиквенс 16S рРНК. Порівняльний аналіз секвенованого фрагмента гена 16S рРНК штаму *B. amyloliquefaciens* IMB B-7513 за допомогою програми BLAST виявив 99 % гомології з представниками кількох видів роду *Bacillus*, а саме *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. atrophaeus*, *B. velezensis*. Для уточнення систематичного положення досліджуваного штаму був проведений аналіз гіперваріабельної ділянки гена 16S рРНК, який вважається найбільш інформативним при ідентифікації та класифікації спороутворювальних бактерій роду *Bacillus* [16]. Результати аналізу профілю поліморфних нуклеотидів колекційних типових штамів *B. subtilis* підвидів *subtilis* і *spizizenii*, *B. amyloliquefaciens*, *B. atrophaeus*, *B. mojavensis*, *B. vallismortis*, *B. velezensis*, а також штамів з Української колекції мікроорганізмів показали схожий спектр з видом *B. amyloliquefaciens* (табл. 3).

Окрім того, на підставі аналізу нуклеотидної послідовності гена 16S рРНК була побудована дендрограма філогенетичних взаємовідносин між різними представниками бактерій роду *Bacillus* (рис. 1).



**Рис. 1.** Дендрограма філогенетичних взаємовідносин штаму *Bacillus* sp. 1.1 з типовими штамми бактерій роду *Bacillus*, побудована на основі нуклеотидних послідовностей гена 16S рРНК з використанням алгоритму Neighbour-Joining

**Таблиця 3.**

**Профілі поліморфних нуклеотидів сиквенсів гена 16S рРНК у бактерій групи *B. subtilis***

Види, штами, алелі	Позиція поліморфних нуклеотидів								
	180	185	202	234	271	285	465	472	483
<i>B. amyloliquefaciens</i> DSM7 алелі С, D, E, F, F, H, I	С	Т	А	G	С	G	G	А	С
<i>B. amyloliquefaciens</i> subsp. <i>amyloliquefaciens</i> DSM7 алелі А та В; <i>B. amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> FZB42 алелі А, В, G та J; UCM В-5044, UCM В-5113, <b><i>Bacillus</i> sp. 1.1</b>	<b>G</b>	<b>С</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>С</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>А</b>	<b>С</b>
<i>B. amyloliquefaciens</i> FZB42 алелі С, D, E, H та I; ' <i>B. velezensis</i> ' C6-1 та 1-3; UCM В-5139 та UCM В-5051	G	Т	G	G	С	А	G	А	С
' <i>B. velezensis</i> ' CR-502T	G	Т	G	А	С	А	G	А	С
<i>B. atrophaeus</i> DSM 7264T; <i>B. vallismortis</i> BCRC 17183	С	Т	А	G	С	А	G	А	С
<i>B. atrophaeus</i> ATCC51189, GBSC56, LSSC22; <i>B. vallismortis</i> DSM 11031T	С	Т	А	G	Т	А	G	А	С
<i>B. axarquiensis</i> LMG 22476; <i>B. malacitensis</i> LMG 22477; <i>B. mojavensis</i> 3EC4B2; <i>B. subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> DSM 347 <sup>T</sup> ATCC 6633 алелі А й В	С	Т	А	G	Т	А	А	G	Т
<i>B. mojavensis</i> DSM 9205T; <i>Bacillus</i> sp. UCM В-5051	С	Т	А	G	С	А	А	G	Т
<i>B. subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> В-5014	С	Т	А	А	Т	А	А	G	Т
<i>B. subtilis</i> ssp. <i>subtilis</i> DSM 10 <sup>T</sup> та 168 алелі В, D, G, H, W; <i>B. subtilis</i> UCM В-5184	G	Т	А	G	С	А	А	G	Т
<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> 168 алелі Е й І <i>B. subtilis</i> UCM В-5049	G	Т	А	G	Т	А	А	G	Т
<i>B. subtilis</i> 168 алель А	G	Т	А	G	С	G	А	G	Т
<i>B. subtilis</i> 168 алель С	G	Т	А	G	С	G	G	G	Т
<i>B. subtilis</i> 168 алель J	G	Т	А	G	Т	А	G	G	Т

На побудованій дендрограмі досліджуваний штам увійшов в одну групу зі штамми *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* УКМ В-5033, *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* УКМ -5113 та ін., однак відокремлений від культур *B. subtilis*. Слід відзначити також високий рівень відмінності штаму *Bacillus* sp.1.1 від кластеру бактерій *B. cereus*, *B. pumilis*, *B. indicus* та *B. firmus*.

Отже, на основі поліфазного таксономічного аналізу штам *Bacillus* sp. 1.1 віднесено до виду *B. amyloliquefaciens*, сиквенс 16S рРНК штаму зареєстровано та внесено до бази GenBank (КТ 151947).

**А.А. Нечипуренко, М.А. Хархота, Л.Б. Зелена, А.М. Остапчук, Л.В. Авдеева**

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

## **ПОЛИФАЗНЫЙ ТАКСОНОМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ КАРОТИНСИНТЕЗИРУЮЩЕГО ШТАММА *BACILLUS* SP. 1.1, ПЕРСПЕКТИВНОГО ДЛЯ СОЗДАНИЯ ПРОБИОТИКА**

### **Резюме**

Проведено поліфазний таксономічний аналіз каротинсинтезуючого штаму *Bacillus* sp. 1.1, перспективного для створення пробіотику. На основі культурально-морфологічних і фізіолого-біохімічних ознак досліджуваного штаму віднесено до виду *Bacillus subtilis*. Незважаючи на це, жирнокислотний профіль клітинних стінок штаму представлений переважно розгалуженими производними ізо- і антиізо-  $C_{15:0}$  і  $C_{17:0}$  сполучень (більше 70 %), що характерно для виду *Bacillus amyloliquefaciens*. На основі нуклеотидної послідовності гена 16S рРНК, а також профіля поліморфних нуклеотидів штаму віднесено до виду *Bacillus amyloliquefaciens*.

*Ключевые слова:* штам *Bacillus* sp., поліфазний таксономічний аналіз.

**О.О. Нечипуренко, М.А. Хархота, Л.Б. Зелена,  
А.М. Остапчук, Л.В. Авдеева**

*Zabolotnogo Institute of Microbiology and Virology, NAS of Ukraine,  
154 Acad. Zabolotnogo St., Kyiv, 03143, Ukraine*

## **POLYPHASIC TAXONOMIC ANALYSIS OF CAROTENE-SYNTHESIZING STRAIN *BACILLUS* SP. 1.1, PERSPECTIVE FOR THE CREATION OF PROBIOTIC**

### **Summary**

It was done the polyphasic taxonomic analysis of carotene synthesizing strain *Bacillus* sp. 1.1, perspective for the creation of probiotic. The investigated strain was referred to the species *Bacillus subtilis* based on of cultural-morphological, physiological and biochemical features. Despite this the fatty acid profile of the cell walls of this strain is predominantly presented by branched derivatives of iso- and antiiso  $C_{15:0}$  and  $C_{17:0}$  compounds (over

70 %), which is typical for the species *Bacillus amyloliquefaciens*. Based on the nucleotide sequence of 16S rRNA gene, and the profile of polymorphic nucleotides strain was referred to the species *Bacillus amyloliquefaciens*.

*Key words:* strain *Bacillus sp.*, polyphasic taxonomic analysis

1. Авдєєва Л.В., Нечипуренко О.О., Хархота М.А. Пробиотичні властивості каротинсинтезувальних штамів *Bacillus sp.* 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 // Мікробіологічний журнал. – 2015. – Т. 77, № 2. – С. 22–27.
2. Нечипуренко О.О. Природа та фізико-хімічні властивості каротиноїдних пігментів штамів *Bacillus sp.* 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113. / О. Нечипуренко, М. Хархота, Л. Авдєєва, Л. Зелена // XI Український біохімічний конгрес (6–10 жовтня 2014 року, Київ) : тез. доп. – Київ, 2014. – С. 34.
3. Похиленко В.Д. Пробиотики на основе спорообразующих бактерий и их безопасность / В.Д. Похиленко, В.В. Перельгин // Химическая и биологическая безопасность. – 2007. – №. 2 – С. 32–33.
4. Смирнов В.В., Резник С.Р., Сорокулова И.Б. Методические рекомендации по выделению и идентификации бактерий группы *Bacillus subtilis-mesentericus* из организма человека и животных – Київ: «Наукова думка», 1980. – 26 с.
5. Ушакова Н.А., Некрасов Р.В., Правдин В.Г. Новое поколение пробиотических препаратов кормового назначения // Фундаментальные исследования. – 2012. – № 1. – С. 184–193.
6. Amin M., Rakhisi Z., Ahmady A.Z. Isolation and identification of *Bacillus* species from soil and evaluation of their antibacterial properties // J Clin Microb Infec. – 2015. – Vol. 2 – P. 1–4.
7. Berkeley R., Heyndrickx M., Logan N. Applications and systematics of *Bacillus* and relatives - Wiley-Blackwell, 2002. – 336 p.
8. 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.
9. Ehrhardt C.J., Chu V., Brown T.C., Simmons T.L., Swan B.K., Bannan J., Robertson J.M. Use of fatty acid methyl ester profiles for discrimination of *Bacillus cereus* T-Strain spores grown on different media // App. and Envir. Microbiol. – 2010. – Vol. 76, № 2 – P. 1902–1912.
10. Erem F., Certel M., Karakaş B. Identification of *Bacillus* species isolated from ropey breads both with classical methods and api identification kits // Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi. – 2009. – Vol. 22. – P. 201–210.
11. Flores O., Belanche L.A., Blanch A.R. New multiplatform computer program for numerical identification of microorganisms // Journal Clinical Microbiology. – 2009. – Vol. 47– P. 4133–4135.
12. Hwang K.Y., Cho J.H., Lee J.Y., Kang K.D. The benefits of using bacillus as a probiotic // Journal of animal and veterinary advances. – 2012. – Vol. 18. – P. 3457–4362.
13. Lane D.G. Nucleic acids techniques in bacterial systematic // Ed by E. Stackebrandt and M. Goodfellow. – Chichester, United Kingdom: John Wiley, 1991. – P. 115–175.
14. Perez-Fons L., Steiger S., Khaneja R. Identification and the developmental formation of carotenoid pigments in the yellow/orange *Bacillus* spore-formers // Biochimica et Biophysica Acta – 2011. – № 1811. – P. 177–185.
15. Reva O.N., Sorokulova I.B., Smirnov V.V. Simplified technique for identification of the



- aerobic spore-forming bacteria by phenotype // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2001. – Vol. 51 – P. 1361–1371.
16. *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.
17. *Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S.* MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods // *Molecular Biology and Evolution*. – 2011. – Vol. 28. – P. 2731–2739.

Отримано 17.09.2015