

IDENTIFICATION OF SOLVENTOGENIC BACTERIA
CLOSTRIDIUM BEIJERINCKII AND *CLOSTRIDIUM*
ACETOBUTYLICUM ISOLATED FROM NATURAL
SOURCES

S. Skrotskyi, L. Khomenko, O. Vasyliuk, L. Zelena, S. Voychuk
Danylo Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of the NASU

Key words:

Clostridium
Biobutanol
Identification
PCR
Solventogenic bacteria

Article history:

Received 18.07.2019
Received in revised form
09.08.2019
Accepted 22.08.2019

Corresponding author:

S. Skrotskyi
E-mail:
bio-imv@ukr.net

ABSTRACT

Anaerobic solvent-producing bacteria (those producing acetone, butanol and ethanol) were studied. The solventogenic bacteria isolated from different ecological niches were identified. Four active strains producing acetone-butanol-ethanol were selected on the basis of their ability to form acetone (3.8—5.0 g/l).

The morphological changes of clostridia cells were studied by electron microscopy. Vegetative cells occurred as short or long rods with rounded ends, as single cells or in pairs, the mean cell size is 0.6 ± 1.5 to 2.4 ± 6.7 μm . At the end of the exponential growth phase rod-shaped cells began to accumulate granules and turned to cigar-shaped. All strains were motile (had flagella).

All isolated strains assimilated arabinose, galactose, glucose, galactose, lactose, maltose, xylose, mannose, sucrose, raffinose, trehalose, fructose, but not glycerol, ribose, sorbitol. Formed indole, urease, lipase, lecithinase. Under anaerobic conditions all strains formed n-butyl alcohol, acetone, ethanol and produced carbon dioxide and hydrogen when cultivated in a medium containing 6% barley, rye, corn mash and Rushman's medium.

The most active butanol producers were identified on the basis of phenotypic characteristics and 16S rDNA sequence: IMV B-7807 strain as *Clostridium acetobutylicum*, IMV B-7701, IMV B-7702 and IMV B-7806 as *Clostridium beijerinckii*. The 16S rDNA sequence of these strains were deposited in GenBank database.

**ІДЕНТИФІКАЦІЯ СОЛЬВЕНТОГЕННИХ БАКТЕРІЙ
CLOSTRIDIUM BEIJERINCKII, *CLOSTRIDIUM
АСЕТОВУТУЛІСУМ*, ІЗОЛЬОВАНИХ З ПРИРОДНИХ
ДЖЕРЕЛ**

С. О. Скроцький, Л. А. Хоменко, О. М. Василюк, Л. Б. Зелена, С. І. Войчук
Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України

У статті досліджено анаеробні сольвентогенні бактерії (тобто такі, що утворюють розчинники бутанол, ацетон, етанол). Проведено ідентифікацію природних ізолятів сольвентогенних бактерій з різних еконіш. Відібрано чотири активні штами-продуценти ацетону-бутанолу-етанолу за здатністю до утворення ацетону (3,8—5,0 г/л).

Вивчено морфологічні зміни клітин штамів роду *Clostridium* з використанням електронного мікроскопа. Показано, що вегетативні клітини мають форму прямих коротких або довгих паличок із закругленими кінцями (середній розмір від $0,6 \pm 1,5$ до $2,4 \pm 6,7$ мк), що розміщені поодинокі або утворюють пари. У кінці експоненційної фази росту паличковидні клітини починають накопичувати гранульозу, а форма клітини змінюється на сигаровидну (форму клостридій). Усі штами були рухливі (мали джгутики).

Виявлено, що всі штами засвоювали моноцукри: арабінозу, галактозу, глюкозу, галактозу, лактозу, мальтозу, ксилозу, манозу, сахарозу, рафінозу, трегалозу, фруктозу, але не гліцерин, рибозу, сорбіту. Утворювали індол, уреазу, ліпазу, лецитіназу. Досліджені штами в анаеробних умовах утворюють *n*-бутиловий спирт, ацетон, етанол і виділяють вуглекислий газ і водень при культивуванні на середовищі з 6% ячмінним, житнім, кукурудзяним заторами та на середовищі Рушмана.

На підставі фенотипових і генетичних досліджень ізолятів, які показали максимальну продукцію бутанолу, проведено ідентифікацію та встановлено, що штам IMB B-7807 належить до виду *Clostridium acetobutylicum*, а штами IMB B-7701, IMB B-7702, IMB B-7806 до виду *Clostridium beijerinckii*. Послідовності 16S рДНК бактеріальних ізолятів, використаних у процесі дослідження, були депоновані в базах даних GenBank.

Ключові слова: *Clostridium*, біобутанол, ідентифікація, ПЛР, сольвентогенні бактерії.

Постановка проблеми. Останнім часом у зв'язку з систематичним підвищенням цін на нафту зростає активність у пошуку альтернативних джерел енергії. Значне місце серед них займає біопаливо [1—4], яке має ряд важливих переваг: низька ціна, обумовлена використанням місцевої сировини для виробництва, та екологічна чистота. За своїми характеристиками біобутанол подібний до бензину та може використовуватись у транспортних засобах без зміни двигунів або їх конструкції [5]. Світовий ринок бутанолу сьогодні перевищує 4,5 млрд літрів і оцінюється більше, ніж у 6 млрд дол. США [4].

Поставка біопалива до кінцевого споживача може бути налагоджена на базі вже наявної інфраструктури постачання палива [6; 7].

Штами роду *Clostridia* — це один з найвідоміших комерційних мікроорганізмів, які придатні до перетворення великої кількості відновлювальної рослинної біомаси та відходів сільського господарства в бутанол, ацетон, етанол, масляну та оцтову кислоти. Серед мікроорганізмів роду *Clostridium* декілька видів можуть синтезувати органічні розчинники та органічні кислоти при ферментації широкого спектра вуглеводних субстратів [8—10]. Одним із видів, що викликають особливу зацікавленість як потенційний сольвентогенний мікроорганізм, є *Clostridium acetobutylicum*. Він здатний до швидкого перетворення цукрів у розчинники шляхом ферментації ацетон-бутанол-етанол (АБЕ). Його використовували з часів Першої світової війни й до середини минулого століття в промисловому масштабі, спочатку для виробництва ацетону, а потім для виробництва бутанолу [11]. Ціна на сировину зробила процес АБЕ економічно не вигідним порівняно з виробництвом бутанолу в нафтохімічній галузі, що й призвело до закриття АБЕ заводів. Останнім часом інтерес до бутанолу посилюється через переоцінку переваг використання мікробного синтезу бутанолу ацетоно-бутиловими бактеріями роду *Clostridium* та зростання інтересу до їх вивчення.

Метою дослідження є проведення ідентифікації за допомогою фізіолого-біохімічних, мікроскопічних і генетичних методів ізолюваних з природних джерел штамів сольвентогенних бактерій.

Матеріали і методи. *Об'єкт дослідження:* штам мікроорганізмів роду *Clostridium A, Г, Ж, 10, Б* (ІМВ В-77806, ІМВ В-7701, ІМВ В-7702, ІМВ В-7807).

Для підтримки бактеріальних клітин в активній фазі росту, їх культивували на тіоглеколовому бульйоні (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Індія) без струшування під шаром вазелінової олії при 37 °С.

Дослідження морфолого-культуральних і фізіолого-біохімічних властивостей. Ідентифікацію культур проводили за визначниками Бергі [12]. Для порівняльних досліджень при встановленні систематичного положення культур як еталонні використовували дані щодо типових штамів [13; 14].

Культурально-морфологічні ознаки АББ вивчали на основі загальнозжиганих методів [15—17]. Колір, інтенсивність забарвлення і консистенцію колоній визначали у сьомі добових культур на чашках Петрі з МПА.

Світлова мікроскопія. Форму і розмір клітин досліджували у 24—48 годинних культур після їх росту на ТГГ за допомогою світлового мікроскопу Carl Zeiss Primo Star (Німеччина), для фотографування використовували камеру Canon PowerShot A640 (Японія). При визначенні гранульози препарати з фіксованими клітинами фарбували розчином Люголю. А для дослідження морфології клітин використовували метод фарбування кристал-фіолетом.

Електронна мікроскопія. Бактерії вирощували при різних концентраціях бутанолу в тіоглеколовому середовищі при 28°C упродовж 72 год. По 1 мл суспензій бактерій переносили в мікропробірки і центрифугували при 10 000 rpm 5 хв, ресуспендували в 950 мкл фосфатно-сольового буфера (ФСБ рН 7,2) і

вносили 50 мкл глутарового альдегіду (25%). Через 15 хв при кімнатній температурі зразки двічі відмивали від глутарового альдегіду центрифугуванням, щоразу витримуючи 15 хв в ФСБ. Після останньої промивки проби ресуспендували в 700 мкл ФСБ і вносили 300 мкл метанолу. Проби поміщали в холодильник і зберігали при 4—10°C.

Визначення розмірів клітин, їх загальної морфології проводили методом електронної мікроскопії. Для цього готували спиртові суспензії клітин, для висушування при кімнатній температурі наносили на мідні сіточки із вуглецевим покриттям. Після цього клітини аналізували за допомогою трансмісійного електронного мікроскопа JEM-1400 (Jeol, Японія) при прискорюючій напрузі 80 кВ та інструментальному збільшенні $\times 50$ тис. — $\times 100$ тис.

Філогенетичний аналіз. Бактеріальну ДНК виділяли з суспензії бактеріальних клітин з використанням набору GeneJet Genomic DNA Purification Kit (ThermoScientific), згідно з інструкцією виробника. Ампліфікацію гена 16S рРНК проводили з праймерами 27f (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') і 1492r (5'-CGGTTACSTTGTTCGA CTT-3') за такоготемпературного режиму: 95°C, 2 хв; 30 циклів — 95°C, 30 с; 55°C, 45 с; 72°C, 90 с; кінцева елонгація 72°C, 7 хв ПЛР-суміш, об'ємом 25 мкл, містила 12,5 мкл 2 \times DreamTaq PCR Master Mix (ThermoScientific), 30 пкмоль кожного праймера та 50 нг ДНК. ПЛР проводили на ампліфікаторі Mastercycler Personal 5332 (Eppendorf, Німеччина). Продукти ПЛР розділяли у 1,7% агарозному гелі, що містив 0,01% бромистого етидію. Результати візуалізували в УФ-світлі. Отриманий амплікон розміром ~ 1500 п.н. вирізали з гелю й очищували за допомогою набору GeneJet PCR Purification Kit (ThermoScientific). Концентрацію ДНК визначали на спектрофотометрі DS-11 FX+ (DeNovix, США). Очищений ПЛР-продукт сиквенували у двох напрямках на приладі «Genetic Analyzer 3130» (Applied Biosystems, США) з використанням набору реактивів «BigDye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit». Отриману нуклеотидну послідовність порівнювали з внесеними до бази даних GenBank за допомогою програми NCBI Blastn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Філогенетичний аналіз, вирівнювання нуклеотидних послідовностей 16S рДНК представників різних видів роду *Clostridium* здійснювали за допомогою програми MEGA 5. Дендрограму філогенетичних зв'язків будували за допомогою методу найближчого зв'язування (Neighbor Joining) з використанням двопараметричної моделі Кімури по 1000 реплікам бутстреп-аналізу. Послідовності гена 16S рРНК типових культур бактерій роду *Clostridium* були взяті з бази даних GenBank.

Наявність у середовищі культивування ацетону визначали якісною реакцією, яка базується на взаємодії (конденсації) фенолігдрозинів з кетонами з утворенням фенолігдрозонів. При наявності ацетону в досліджуваних зразках випадає білий осад [8].

Статистична обробка отриманих результатів. Результати досліджень обробляли статистичними методами [18] з використанням *t*-критерію Стьюдента. Підрахунки проводили за допомогою пакета програмних засобів Microsoft Excel [19].

Результати та обговорення. Природні ізоляти сольвентогенних бактерій були виділені попередньо з різних еконіш: річковий мул, чорнозем, польовий і лісовий ґрунти, торф, активний мул очисних споруд. Відбір штамів-продуцентів ацетону-бутанолу-етанолу проводили візуально за виділенням вуглекислого газу, розрідженням щільного поживного середовища та загальним його освітленням, а також за наявністю спор, позитивним забарвленням по Граму. Початковий відбір проводили за здатністю до утворення ацетону, в результаті чого виявлено, що у 4 активних штамів його кількість становила 3,8—5,0 г/л (табл. 1). У результаті вищеназваних ознак ізоляти спочатку були віднесені до роду *Clostridium*.

Таблиця 1. Досліджені штами

Робочий номер	Місце виділення	Кількість ацетону, г/л
А	Активний мул водоочисних споруд, м. Яготин	5,0
Г	Курячий послід	3,8
Ж	Силосна яма, м. Яготин	4,3
10	Жомова яма, м. Яготин	4,5

За морфологією всі штами утворювали колонії від 2—5 мм, круглі, підняті з цілим краєм, від сірого до сірувато-білого кольору, напівпрозорі, глянцеві (рис 1).

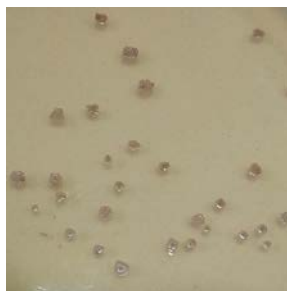


Рис. 1. Поодинокі колонії штаму *Clostridium* spp. на чашці з агаром (ТГГ)

На електронному мікроскопі досконало вивчені морфологічні зміни клітин штамів роду *Clostridium*. Показано, що вегетативні клітини мають форму прямих коротких або довгих паличок із закругленими кінцями, середній розмір $0,6 \pm 1,5$ до $2,4 \pm 6,7$ μm , розміщені поодинокі або утворюють пари (рис. 2). Для штаму 10 розмір клітин становив $0,6$ — $0,9$ до $2,4$ — $4,7$ μm та для штамів А, Г, Ж — $1,5$ — $7,5$ μm . У кінці експоненційної фази росту паличко-видні клітини починають накопичувати гранульозу, яка за даними наукової літератури, в основному складається з α -1,4-зв'язаного поліглюкану [20]. В результаті форма клітини змінюється на сигаровидну, тобто форму клостридій (рис. 3 А, Б). Ці морфологічні зміни зазвичай асоційовані з перемиканням метаболізму від синтезу кислот до синтезу нейтральних продуктів — спиртів і ацетону. Клітини старіючої культури переходять до спороутворення (рис. 2 Д, Е, та рис. 3 Б, В). Ендоспори мають овальну або сферичну форму.

Спори можуть переносити різні стресові стани (ультрафіолетове світло, засуху чи мороз), а при покращенні умов вони проростають і починається новий цикл розвитку бактерій [21]. Усі штами були рухливі (мали джгутики).

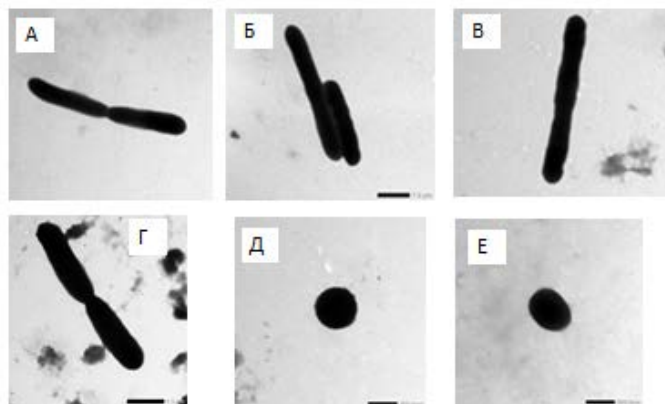


Рис. 2. Морфологічна характеристика при мікроскопіюванні на електронному мікроскопі (збільшення $\times 80000$) штамів роду *Clostridium*. А—Г) прямі палички; Мітка 1 μm . Д—Е) спори. Мітка 500 нм

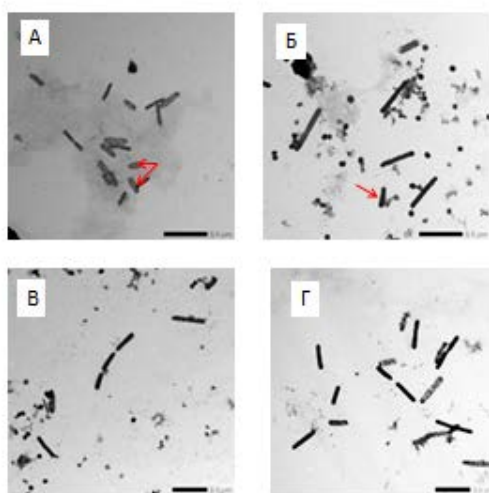


Рис. 3. Морфологічна характеристика при мікроскопіюванні на електронному мікроскопі (збільшення $\times 80000$) штамів роду *Clostridium*. А, Б) сигароподібні клітини клітини; А—Г) прямі палички; Б-В) спори. Мітка 5 μm

Виділені штами гетеротрофні, облігатні анаероби, желатин не розріджують, м'ясо-пептоний агар розривають внаслідок утворення газів.

Досліджені фізіолого-біохімічні властивості штамів збігаються з описаними для роду *Clostridium* (табл. 2). Усі штами засвоювали моноцукри: арабінозу,

галактозу, глюкозу, галактозу, лактозу, мальтозу, ксилозу, манозу, ахарозу, рафінозу, трегалозу, фруктозу, але не гліцерин, рибозу, сорбіту. Утворювали індол, уреазу, ліпазу, лецитіназу.

Таблиця 2. Основні фізіолого-біохімічні ознаки штамів роду Clostridium

Характеристики	10	A	Г	Ж
Засвоєння:				
арабінози, галактози, глюкози, галактози, лактози*, мальтози*, ксилоза, манози*, сахарози, рафінози*, трегалоза, фруктози гліцерину, рибози*, сорбіту*	+	+	+	+
глікогену	-	-	-	-
дульциту*	+	-	-	-
інозиту	-	+	+	+
інуліну	-	+	+	+
маніту*	+	-	-	-
меліцитоза	-	+	+	+
мелібіоза	-	+	+	+
саліцин*	+	-	-	-
трегалоза	-	+	+	+
целобіоза	-	+	+	+
Утворення:				
Індолу, уреазу, ліпази, лецитінази	-	-	-	-
H ₂ S*, казеїну, рибофлавіну на молоці	+	-	-	-
Нітратредукція*	+	-	-	-
Гідроліз:				
крохмалю*, желатину*	+	-	-	-
Чутливість до рифампіциліну*	чутливі	резист	резист	резист

Примітка: позитивна реакція (+); негативна реакція (-); зірочкою (*) відмічені діагностичні ознаки.

Встановлено, що штам 10 (на відміну від інших досліджуваних штамів) характеризувався такими діагностичними ознаками: був здатний до засвоєння глікогену, дульцину, маніту, саліцину та утворював H₂S, казеїн і рибофлавін на молоці (діагностичні ознаки). Відомо, що *C. acetobutylicum* відрізняється від *C. beijerinckii* здатністю до розрідження желатину та відсутністю її у звурдженні молока, утворенні рибофлавіну та чутливості до рифампіцину. Всі досліджені штами в анаеробних умовах утворюють *n*-бутиловий спирт, ацетон, етанол і виділяють вуглекислий газ та водень при культивуванні на середовищі з 6% ячмінним, житнім, кукурудзяним заторами та середовищі Рушмана.

Тож досліджені штами були віднесені до видів: *Clostridium beijerinckii* (A, Г, Ж) та *Clostridium acetobutylicum* (штам 10). Ідентифіковані штами були визначені як непатогенні та нетоксичні, депоновані у Депозитарії Інституту мікробіології та вірусології НАН України ім. Д. К. Заболотного як *Clostridium*

beijerinckii IMB B-7701 (штам Г), IMB B-7702 (штам Ж), MB B- 7806 (штам А), *Clostridium acetobutylicum* IMB B-7807 (штам 10).

З огляду на те, що багато досліджень підтверджують невідповідність культурально-морфологічних і фенотипічних особливостей штамів з молекулярно-філогенетичним аналізом [13; 22—24], був застосований молекулярно-генетичний метод — ПЛР. У результаті реакції сиквенування штамів отримана нуклеотидна послідовність фрагмента гена 16S рРНК довжиною 1500 пар нуклеотидів. Нуклеотидні послідовності штамів зареєстровані у базі GenBank (табл. 3). Порівняльний аналіз сиквенса досліджуваних штамів з послідовностями гена 16S рРНК (рис. 4), задепонованими у базі даних GenBank, виявив його приналежність до роду *Clostridium*. Найвищий рівень схожості послідовності виявлено між штамом 10 та *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 і JCM1419 (100%), високі рівні схожості (93,0%) виявлені між IMB B-7807 та *Clostridium tyrobutyricum* та *Clostridium pasteurianum*.

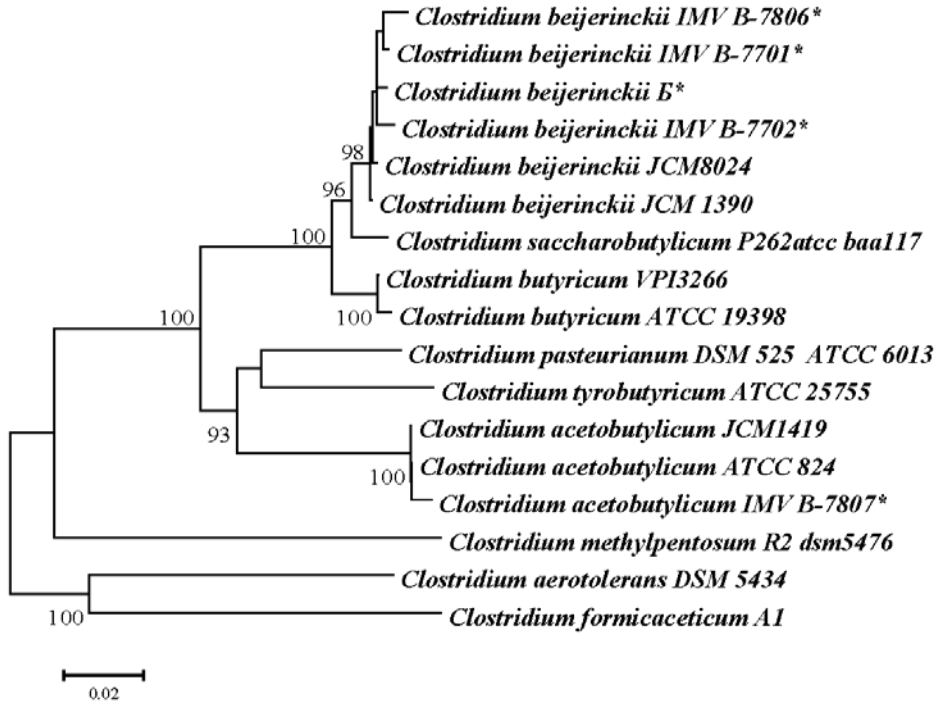


Рис. 3. Дендрограма філогенетичних зв'язків між досліджуваними штамми та типовими штамми бактерій роду *Clostridium*, побудована на основі нуклеотидних послідовностей гена 16S рРНК за допомогою методу найближчого зв'язування (Neighbor Joining) з використанням двопараметричної моделі Кімури (цифрами вказана статистична достовірність точки розгалуження, визначена за допомогою бутстреп-аналізу)

Таблиця 3. Видова належність досліджуваних штамів та їх номер в GenBank і Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології НАН України ім. Д. К. Заболотного

Робочий номер штаму	Видова назва	Номер у Депозитарії Інституту мікробіології та вірусології НАН	Номер GenBank (аналізом нуклеотидної послідовності 16S рДНК)
1	2	3	4
А	<i>Clostridium beijerinckii</i>	ІМВ В-7806	МК463633 (МК463635)
Г	<i>Clostridium beijerinckii</i>	ІМВ В-7701	MN006695 (MN006702)
Ж	<i>Clostridium beijerinckii</i>	ІМВ В-7702	MN006696 (MN006703)
10	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	ІМВ В-7807	МК463632 (МК463634)

На основі отриманих даних побудоване філогенетичне дерево, яке визначає місце досліджуваних штамів серед інших видів роду *Clostridium* (рис. 4). Виявлено, що штам ІМВ В-7807 формував спільний кластер із типовим штамом виду *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. А штами ІМВ В-7701 (штам Г), ІМВ В-7702 (штам Ж), ІМВ В-7806 (штам А) показували схожість з *Clostridium beijerinckii* JCM8024 та JCM1390 (типовий ATCC 25752) на 98% та *Clostridium saccharobutylicum* P262atccbaa117 на 96%. Для всіх досліджених штамів була підтверджена належність до виду *Clostridium beijerinckii* ІМВ В-7701, ІМВ В-7702, ІМВ В-7806 та *Clostridium acetobutylicum* штам ІМВ В-7807.

Висновки

Отже, на підставі фенотипових і генетичних досліджень ізолятів, які показали максимальну продукцію бутанолу, була проведена ідентифікація та встановлено, що штам ІМВ В-7807 належить до виду *Clostridium acetobutylicum*, а штами ІМВ В-7701, ІМВ В-7702, ІМВ В-7806 до виду *Clostridium beijerinckii*. Послідовність 16S рДНК бактеріальних ізолятів, використаних у роботі, депонована в базах даних GenBank.

Література

1. Храпцов А.Г., Василисин С.В. Промышленная переработка вторичного молочного сырья. М.: *Делу принт*. 2003, 232 с.
2. Івашко Р.Г. Біопаливо. Україна — 2008. Міжнародна промислова конференція і виставка «Біопаливо. Україна — 2008» Тез. доп. — К.: Наук. думка. 2008. С. 58.
3. Demirbas A. Political, economic and environmental impacts of biofuels: A review. *Appl. Energy*. 2009, 86: 108-117.
4. Jones D. T., Woods D. Acetone-butanol fermentation revisited. *Microbiology Reviews*. 1986, 50: 484-524.
5. Visioli L.J, Enzweiler H., Kuhn R.C, Schwaab M., Mazutti M.A. Recent advances on biobutanol production. Sustainable Chemical Processes. *Sustainable Chemical Processes*. 2014, 2:15. <https://doi.org/10.1186/2043-7129-2-15>.
6. Papoutsakis E.T. Engineering solventogenic clostridia. *J. Current opinion in biotechnology*. 2008, 19: 420-429. DOI:10.1016/j.copbio.2008.08.003.

7. Андрусихина И. Наночастицы металлов: способы получения, физико-химические свойства, методы исследования и оценка токсичности. *Сучасні проблеми токсикології*. 2011, 3: 5—14.
8. Патент RU 2455350C1. Штамм бактерий *Clostridium acetobutylicum* — продуцент н-бутанола. Сушкова В. И., Яроцкий С. В. выдано 2012.07.10.
9. WO2012035420A1. *Clostridium beijerinckii* DSM 23638 and its use in the production of butanol. Daniele Bianchi Francesca, De Ferra Luca, Paolo Serbolisca. 2012.03.22.
10. Патент RU2393213C1. Штамм бактерий *Clostridium acetobutylicum* — продуцент н-бутилового спирта, ацетона и этанола. Поляков В.А., Римарева Л.В., Галкина Г. В., Илларионова В. И., Куксова Е.В., Горбатова Е.В., Волкова Г.С. Выдано 2010.06.27.
11. Killeffer D.H. Butanol and acetone from corn: A description of the fermentation process. *Industrial & Engineering Chemistry*. 1927, 19 (1): C.46-50.
12. Ed. J. Houlta. The Shorter Bergey's Manual of Determinant Bacteriology. *Moscow, Mir*. 1980, 495 p.
13. Keis S., Bennett C. F., Ward V. K., Jones D. T. Taxonomy and phylogeny of industrial solvent-producing clostridia. *Int J Syst Bacteriol*. 1995, 45: 693—705.
14. McCoy E., Fred E. B., Peterson W. H., Hastings E. G. A cultural study of the acetone butyl alcohol organism. *J Infect Dis*. 1926, 39: 457—484.
15. Лабинской А. С. Микробиология с техникой микробиологических исследований. Под ред.— М.: Медицина. 1972, 497 с.
16. Звягинцева Д. Г. Методы почвенной микробиологии и биохимии. Изд-во МГУ. 1991, 303 с.
17. Селибер Г. Л. Большой практикум по микробиологии. М.: Высшая школа. 1962, С. 16—17.
18. Лакин Г. Ф. Биометрия. Москва. Высшая школа. 1980. 293 с.
19. Лапач С. Н., Чубенко А. В., Бабич П. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с применением «Excel». К.: Морион. 2000. 320 с.
20. Shaheen R., Shirley M., Jones D. T. Comparative fermentation studies of industrial strains belonging to four species of solvent-producing clostridia. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol*. 2000, 2: 115—124.
21. Bowles L. K., Ellefson W. L. Effects of butanol on *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Environ. Microbiol*. 1985, 50: 1165—1170.
22. Jonson L. J., Toth J., Santiwatanakul S., Chen J. S. Cultures of “*Clostridium acetobutylicum*” from Various Collections Comprise *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii*, and two other Distinct Types Based on DNA-DNA Reassociation. *Int. J. of System. Bact*. 1997, 47 (2): 420—424.
23. Wilkinson S. R., Young M., Goodacre R., Morris J. G., Farrow J. A. E., Collins M. D. Phenotypic and genotypic differences between certain strains of *Clostridium acetobutylicum*. *FEMS Microbiology letters*. 1995, 125: 199—204.
24. Keis S., Shaheen R., Jones D. T. Emended descriptions of *Clostridium acetobutylicum* and *Clostridium beijerinckii*, and descriptions of *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* sp. nov. and *Clostridium saccharobutylicum* sp. nov. international. *Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2001, 51: 2095-2103. DOI:10.1099/00207713-51-6-2095.