

УДК 579.64

## СКРИНИНГ ПРИРОДНЫХ ШТАММОВ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ И ИХ ТАКСОНОМИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ

Шурхно Р.А., Вологин С.Г., Гибадуллина Ф.С., Тагиров М.Ш.

*ФГБНУ «Татарский научно-исследовательский институт сельского хозяйства», Казань, Россия (420059, Казань, Оренбургский тракт, 48), e-mail: Ravillya@yandex.ru*

В настоящее время растет интерес исследователей к молочнокислым бактериям, которые вследствие своих физиолого-биохимических и технологических свойств являются определяющими микроорганизмами для создания биологических консервантов различного назначения. В качестве источников выделения изолятов молочнокислых бактерий использованы филосфера многолетних бобовых трав (клевер луговой – *Trifolium pratense* L., сорт Ранний-2 и люцерна изменчивая – *Medicago varia* Martyn, сорт Айслу) и растительный сок из надземной части указанных культур. Из 40 изолятов молочнокислых бактерий были отобраны семь штаммов гомоферментативных лактобацилл со стабильными биотехнологическими признаками. Культуры молочнокислых бактерий рода *Lactobacillus* классическими микробиологическими методами, генотипированием на основе анализа нуклеотидных последовательностей генов *16S rRNA* и *pheS*, а также методом время-пролетной масс-спектрометрии (MALDI-TOF MS) были идентифицированы как *Lactobacillus plantarum*. Штаммы молочнокислых бактерий депонированы во Всероссийской коллекции микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина под номерами: ВКМ В-2342 Д. *Lactobacillus* sp. RS3, ВКМ В-2343 Д. *Lactobacillus* sp. RS4, ВКМ В-2344 Д. *Lactobacillus* sp. RS7 и нуклеотидные последовательности генов четырех идентифицированных штаммов аннотированы в GenBank.

Ключевые слова: изоляты, идентификация, молочнокислые бактерии, филосфера, ризосфера, молекулярно-генетический анализ.

## SCREENING OF NATURAL STRAINS OF LACTIC ACID BACTERIA AND THEIR TAXONOMICAL IDENTIFICATION

Shurkhno R.A., Vologin S.G., Gibadullina F.S., Tagirov M.S.

*Tatar research institute of agriculture, Kazan, Russia (420059, Kazan, Orenburg tract, 48), e-mail: Ravillya@yandex.ru*

Now interest of researchers in lactic acid bacteria, which owing to physiology-biochemical and technological properties are defining microorganisms for creation of biological preservatives of different function, grows. As sources of release of isolates of lactic acid bacteria of an used phyllosphere of long-term bean herbs (a red clover-*Trifolium pratense* L., cultivar grade Early-2 and a alfalfa changeable – *Medicago varia* Martyn, Ayslu's cultivar) and plant juice from elevated part of the specified cultures. From 40 isolates of lactic acid bacteria seven strains, the homofermentative of lactobacilli with stable biotechnological signs selected. Cultures of lactic acid bacteria of the genus *Lactobacillus* by classical microbiological methods, genotyping based on the analysis of nucleotide sequences *16S rRNA* and *pheS* and by method time of flying mass spectrometry (MALDI-TOF MS) were identified as *Lactobacillus plantarum*. Strains of lactic acid bacteria are deposited in the All-Russian collection of microorganisms of Institute of biochemistry and physiology of microorganisms of G. K. Scriabin at numbers: RCM V-2342 D *Lactobacillus* sp. RS3, RCM V-2343 D *Lactobacillus* sp. RS4, RCM V-2344 D *Lactobacillus* sp. RS7 and nucleotide sequences of genes of four identified strains are annotated in GenBank.

Keywords: isolates, identification, lactic acid bacteria, phyllosphere, rhizosphere, molecular and genetic analysis.

Современная биотехнология неразрывно связана с использованием новых подходов к отбору природных микроорганизмов при создании бактериальных препаратов.

Фундаментальные достижения и практические исследования последних десятилетий в микробиологии, генетике и молекулярной биологии дали возможность изучения генетического разнообразия микроорганизмов. С развитием генетической систематики, разнообразием используемых методов, направленных на изучение бактериального генома и

накоплением экспериментальных данных, позволило решить многие спорные вопросы систематики конкретных групп микроорганизмов [10].

До недавнего времени при отборе штаммов для создания бактериальных консервантов использовались в основном классические микробиологические методы. Оценки стартерных культур, такие как выделение, идентификация таксономического положения, проводились на основе изучения их морфологических, культуральных, физиолого-биохимических и технологических свойств. Однако применение только традиционных способов не всегда позволяет эффективно отбирать безопасные и хозяйственно-ценные штаммы молочнокислых бактерий для использования их в качестве биологического агента при ферментации растительной массы.

**В связи с этим целью данной работы** явилось выделение чистых культур молочнокислых бактерий из различных природных субстратов и определение видовой принадлежности полученных лактобацилл классическими и молекулярно-генетическими методами.

#### **Материалы и методы исследования**

*Источники выделения.* В качестве источников выделения изолятов молочнокислых бактерий использовали филосферу многолетних бобовых трав (клевер луговой – *Trifolium pratense* L., сорт Ранний-2 и люцерна изменчивая – *Medicago varia* Martyn, сорт Айслу) и растительный сок из надземной части указанных культур.

Навески проб (5г) надземной части (филосфера) вегетирующих бобовых растений помещали в 45 мл стерильной воды и интенсивно встряхивали на качалке при 120 об/мин в течение 30 мин. Для получения растительного сока бобовых растений использовали листья с черешками и фрагментами стеблей, измельченные до 2–3 см, и растительную массу отжимали с помощью пресса. Полученную субстанцию несколько раз фильтровали через стерильную ткань.

*Культивирование микроорганизмов.* Из полученных биологических материалов готовили серию разведений и высевали на агаризованные среды. Среду сусло-агар (5° по Баллингу) с 2 % карбонатом кальция использовали для выделения молочнокислых изолятов и отбирали колонии с различной зоной растворения мела вокруг них, которая косвенно служила признаком активности кислотообразования изолята молочнокислой бактерии [1,8]. Далее бактериальные изоляты культивировали на жидкой питательной среде MRS [15] с последующим поверхностным пересевом их на агаризованную среду MRS. Среди морфологически идентичных колоний (по окраске, форме, текстуре) для выделения в чистую культуру выбирали одну и пересевали на плотную селективную среду Рогозы [18] с

последующей идентификацией молочнокислых бактерий. Культивировали молочнокислые бактерии при 37 °С.

*Классическая идентификация.* Идентификацию молочнокислых бактерий проводили на основе физиолого-биохимических тестов [13,6,11]. Тесты на каталазную активность, восстановление нитратов, сбраживание сахаров, газообразование, рост при различных температурах и другие признаки определяли с применением стандартных методов [5,3].

*Молекулярно-генетическая идентификация.* Для проведения молекулярно-генетической идентификации отбирали одиночные колонии исследуемых штаммов молочнокислых бактерий, выросшие на плотной питательной среде Рогозы в течение 24 часов при температуре 37 °С. Бактериальные клетки переносили в 1 мл стерильного физиологического раствора, ресуспендировали и осаждали их центрифугированием при 13 000 об/мин в течение 2 мин. Выделение бактериальной ДНК осуществляли по методу, описанному в работе [2], увеличив рабочую концентрацию лизоцима (Serva, Германия) в лизирующем буфере до 1 мг/мл. Амплификацию фрагментов генов *16SpPHK* и *pheS* проводили с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) в смеси финальным объемом 50 мкл, включавшей 5 мкл 20 мМ раствора dNTP, 5 мкл 10x ПЦР буфера, 0.4 мкл 5 ед. акт. Таq ДНК-полимеразы, 1 мкл 50 мкМ каждого смыслового и антисмыслового праймеров, 1 мкл препарата бактериальной ДНК. Для амплификации фрагмента гена *16SpPHK* использовали универсальные прокариотические праймеры *16S-8F* 5'-agagtttgatcctggctcag и *16S-1492R5'*-ggttaccttgtagactt [20]. Для секвенирования использовали праймеры *16S-529R* 5'-acgcttgccacctacgtattac, *16S-806F* 5'-ggactaccagggtatctaata и *16S-U1Rm* 5'-gggccccgtcaattccttgag. При синтезе фрагмента гена *pheS* и при осуществлении секвенирования применяли вырожденные олигонуклеотиды *pheS-21-F* 5'-cauuccngchcgygayatgc и *pheS-22-R5'*-ccwargvccraargcaaarcc [16]. Амплификацию проводили на приборе «MastercyclerGradient» (Eppendorf, Германия) по протоколам, описанным [20,16]. Секвенирование ПЦР-продуктов проводили в лаборатории ЗАО «ЕврогенРу» (Россия) на генетическом анализаторе «ABI PRISM 3100» (Applied Biosystems, США). Результаты обрабатывали с помощью программы BioEdit 7.1.3.0. Процедуру множественного выравнивания последовательностей проводили по алгоритму CrustalW. Идентификацию видовой принадлежности осуществляли путем сравнения полученных последовательностей с базой данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) (NCBI, США). Расчет величин эволюционных дистанций и филогенетический анализ проводили с помощью программы Mega 5.1. согласно рекомендациям [4].

*Идентификация микроорганизмов методом MALDI-TOFMS.* Определение видовой принадлежности изучаемых микроорганизмов проводили на приборе MicroflexMaldiBioTyper

(BrukerDaltonics, Германия). Изолированные колонии микроорганизмов, выросшие на поверхности агаризованной питательной среды Рогозы. Анализ масс-пик листов рибосомальных белковых спектров осуществляли с помощью программного обеспечения MALDI Biotyper 3.1 (BrukerDaltonics, Германия). В качестве сравниваемых штаммов использовали источники из коллекции микроорганизмов DMZS (Германия), выбранные фирмой-производителем при создании прибора. Интерпретацию результатов проводили по шкале, предлагаемой фирмой-производителем: показатель Score с величиной равной 2.0 и более считали надежным для определения вида, в диапазоне от 1.7 до 2.0 надежным для определения рода, показатель менее 1.7 свидетельствовал о ненадежной идентификации.

Продукты брожения анализировали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на приборе Series-200 (PerkinElmer», США) с колонкой C18 (250×4.6 мм), используя рефрактометрический детектор. Пробы готовили с помощью картриджей SerPakC-18 (TESSEK, Чехия), заполненных сорбентом Seraport марки SGX-C18 (зернение 60мкм, диаметр пор 80А). Элюцию проводили 0.1 % раствором ортофосфорной кислоты при температуре 30 °С и скорости потока элюента 0.6 мл/мин. В качестве стандартов использовали водные растворы органических кислот («ACROS», Бельгия).

В работе использовались стандартные методы математической статистики с применением пакета прикладных программ MS Excel.

### **Результаты исследования и их обсуждение**

Применение современных молекулярно-биологических и генотипических подходов при таксономической идентификации молочнокислых бактерий позволяет выбирать стартовые культуры с прогнозируемыми признаками, необходимые для разработки биологических консервантов.

Впервые в условиях Республики Татарстан выделены изоляты молочнокислых бактерий из природных источников, надземной части бобовых культур (философера, растительный сокклевера и люцерны). Начальным этапом наших исследований была индикация и идентификация изолятов молочнокислых бактерий классическими микробиологическими методами. С использованием селективной среды Рогозы осуществили тестирование более 40 изолятов бактерий, что позволило получить 15 изолятов с характерными свойствами возбудителей молочнокислого брожения. Из них, с учетом типа брожения (предпочтение отдано гомоферментативному), скорости и масштабов ацидогенеза, проведен первичный отбор семи изолятов. Темпы и уровень кислотообразования указанных изолятов были подтверждены ВЭЖХ анализом органических кислот. В итоге, по совокупности результатов дифференциально-диагностического тестирования [13,14,11] изоляты отнесены к семейству *Lactobacillaceae*, роду *Lactobacillus*. Для дальнейших

исследований были отобраны 4 штамма молочнокислых бактерий. Результаты фенотипической идентификации полученных четырех штаммов представлены в таблице 1.

**Таблица 1**

Классические идентификационные признаки природных штаммов молочнокислых бактерий

Свойства	Штаммы молочнокислых бактерий			
	<i>RS3</i>	<i>RS4</i>	<i>RS6</i>	<i>RS7</i>
<b>морфологические:</b>				
форма клеток	палочки	палочки	палочки	палочки
окраска по Граму	+	+	+	+
кислотоустойчивость	+	+	+	+
спорообразование	–	–	–	–
подвижность	–	–	–	–
<b>культуральные:</b>				
форма колоний	мелкие выпуклые	мелкие выпуклые	мелкие выпуклые	мелкие выпуклые
цвет колоний	белые матовые	белые матовые	бесцветные	бесцветные
рост на жидких средах	придонный	придонный	равномерный рост по всей толще среды	придонный

Свойства	Штаммы молочнокислых бактерий			
	<i>RS3</i>	<i>RS4</i>	<i>RS6</i>	<i>RS7</i>
<b>сбраживание углеводов:</b>				
глюкоза	+	+	+	+
фруктоза	+	+	+	+
мальтоза	+	+	+	+
сахароза	+	+	+	+
галактоза	+	+	+	+
арабиноза	–	–	–	–
рамноза	–	–	–	–
ксилоза	–	–	–	–
сорбит	–	–	–	–
<b>биохимические:</b>				
рост при 15°C	–	–	–	–
рост при 45°C	–	–	–	–
каталаза	–	–	–	–
восстановление NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	–	–	–	–
газообразование из глюкозы	–	–	–	–
лактат, мг/мл	18.3	14.4	11.1	12.9
ацетат, мг/мл	3.0	1.6	0.9	1.3

+ , активный рост; –, отсутствие роста.

Материалы, отображающие источники происхождения штаммов, представлены в таблице 2.

**Таблица 2**

## Происхождения природных штаммов молочнокислых бактерий

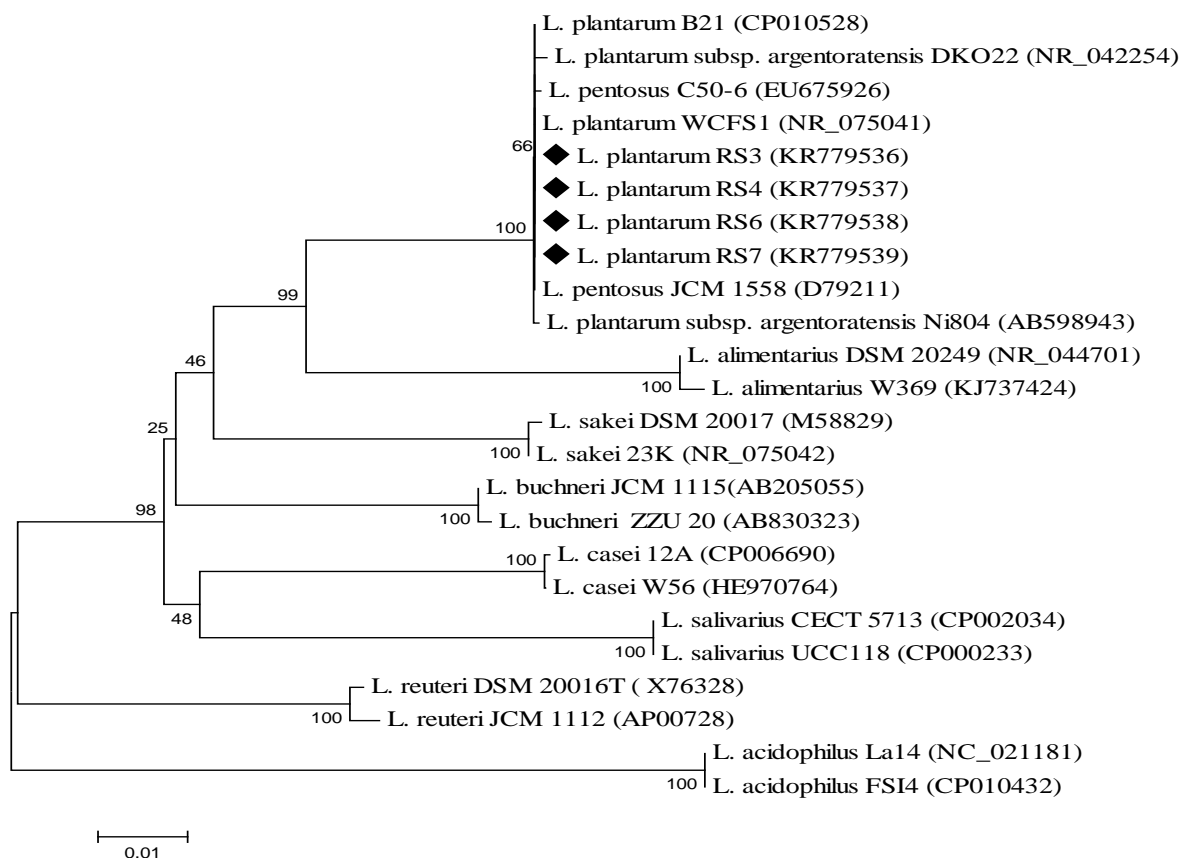
№	Наименование штамма	Источник выделения
1.	<i>Lactobacillus</i> sp. RS3	филосфера люцерны изменчивой ( <i>Medicago varia</i> Martyn)
2.	<i>Lactobacillus</i> sp. RS4	филосфера клевера лугового ( <i>Trifolium pratense</i> L.)
3.	<i>Lactobacillus</i> sp. RS6	растительный сок клевера лугового ( <i>Trifolium pratense</i> L.)
4.	<i>Lactobacillus</i> sp. RS7	растител. сок люцерны изменчивой ( <i>Medicago varia</i> Martyn)

Штаммы молочнокислых бактерий депонированы во Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ) Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина под номерами: ВКМВ-2342 Д*Lactobacillus* sp. RS3, ВКМВ-2343 Д*Lactobacillus* sp. RS4, ВКМВ-2344 Д*Lactobacillus* sp. RS7.

Следует отметить, что применение указанных методов, предусматривающих выделение чистой культуры и определение морфологических, культуральных признаков, спектра сбраживаемых углеводов и биохимических свойств изолятов молочнокислых бактерий, было затратным и требовало достаточно длительного времени для завершения работы и получения результатов. Однако исследования показали, что идентификация молочнокислых бактерий только на основании вышеперечисленных признаков в настоящее время является недостаточной. Так, согласно работам авторов [12,9], многие виды молочнокислых бактерий обладают высоким уровнем фенотипической изменчивости под воздействием различных факторов.

В связи с этим мы продолжили типирование наших природных штаммов молочнокислых бактерий современными молекулярно-биологическими методами для таксономической идентификации. В результате секвенирования штаммов молочнокислых бактерий определены нуклеотидные последовательности гена *16SpPHK* длиной 1437 п.н. Полученные нуклеотидные последовательности были использованы при проведении филогенетического анализа. В качестве сравнения использовали нуклеотидные последовательности генов *16SpPHK* референтных штаммов основных видов рода *Lactobacillus*, полученных из базы данных GenBank (NCBI, США).

Проведенный анализ показал, что идентифицируемые четыре штамма природных молочнокислых бактерий располагались в одном кластере с референтными штаммами, относящимися к видам *Lactobacillus plantarum*, *L. paraplantarum* и *L. pentosus* (рис. 1). На основании этого было сделано заключение, что типлируемые штаммы относятся к группе видов близких к *Lactobacillus plantarum*.

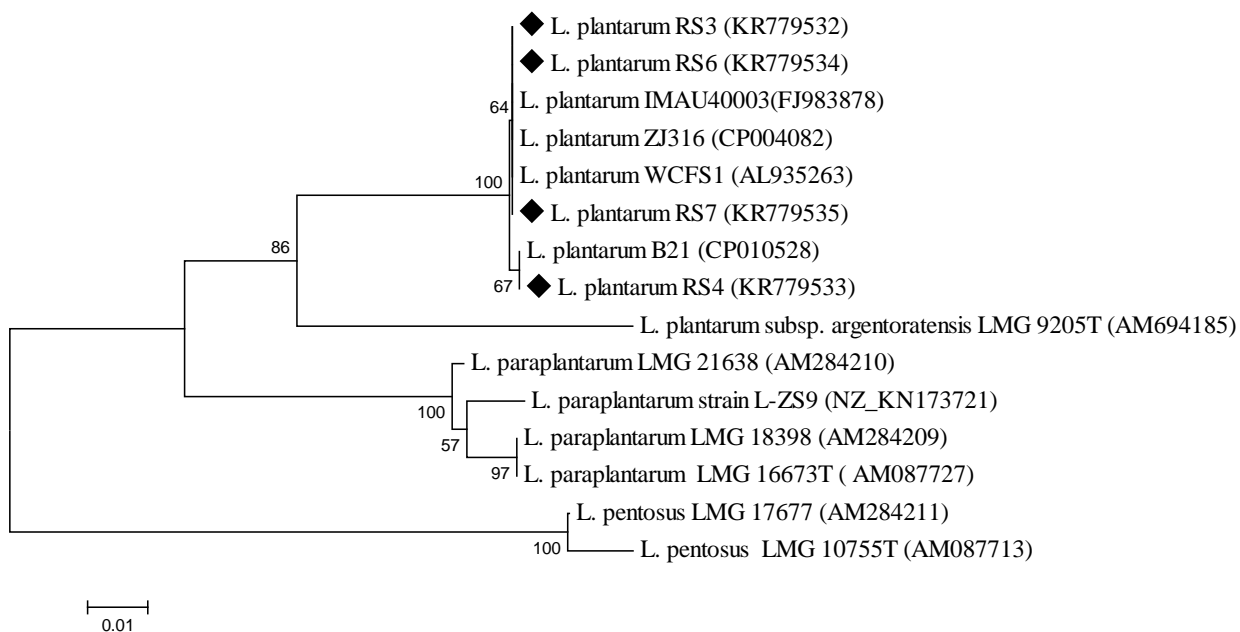


Филогенетическое положение природных штаммов лактобацилл на основании анализа нуклеотидных последовательностей фрагмента гена *16SpPHK*. Расчет величин эволюционных дистанций проведен по модели Джукса – Кантора. Построение дендрограммы осуществлено согласно алгоритму минимума эволюции.

Знаком «◆» – отмечены идентифицируемые штаммы.

Согласно литературным данным различие в нуклеотидных последовательностях генов *16SpPHK* данных видов составляет менее 1 % [17], что не позволяет проводить окончательную надежную видовую идентификацию по данному молекулярному признаку.

Был проведен молекулярно-генетический анализ нуклеотидной последовательности фрагмента гена *pheS* размером 454 п.н. В ходе филогенетического анализа была выявлена локализация всех четырех идентифицируемых в одном кластере с референтными штаммами, относящимися к видам *Lactobacillus plantarum* (рис.2). Примененный подход позволил достоверно дискриминировать идентифицируемые штаммы от видов *Lactobacillus paraplantarum* и *L. pentosus*. В связи с этим штаммы *RS3*, *RS4*, *RS6* и *RS7* были отнесены к виду *Lactobacillus plantarum*.



Филогенетическое положение природных штаммов лактобацилл на основании анализа нуклеотидных последовательностей фрагмента гена *pheS*. Расчет величин эволюционных дистанций проведен по модели Джукса – Кантора. Построение дендрограммы осуществлено согласно алгоритму минимума эволюции.

Знаком «◆» – отмечены идентифицируемые штаммы.

Нуклеотидные последовательности данных штаммов аннотированы в базе данных GenBankNCBI под следующими номерами: *L. plantarumRS3* – KR779536 и 779532, *L. plantarumRS4* – KR779537 и KR779533, *L. plantarumRS6* – KR779538 и KR779534, *L. plantarumRS7* – KR 779539 и KR779535.

С разработкой метода MALDI-TOFMS и накоплением мирового опыта его применения для видовой идентификации микроорганизмов стало возможным быстро и с высокой пропускной способностью типировать их из микробной популяции в биологических субстратах практически без предварительной подготовки образца [7,19].

Применение метода MALDI-TOF MS подтвердило результаты проведенной молекулярно-генетической идентификации видовой принадлежности молочнокислых бактерий. Максимальные величины показателя Score были отмечены при сравнении с референтными штаммами, относящимися к виду *Lactobacillusplantarum* (табл. 3).

**Таблица 3**

Результаты масс-спектрометрической идентификации природных штаммов молочнокислых бактерий

№	Референтные штаммы	ПоказательScore идентифицируемых штаммов			
		<i>L. RS3</i>	<i>L. RS4</i>	<i>L. RS6</i>	<i>L. RS7</i>



1.	<i>Lactobacillus plantarum</i> DSM 1055	2.19	2.32	2.28	2.23
2.	<i>L. plantarum</i> DSM 20246	2.25	2.31	2.27	2.18
3.	<i>L. plantarum</i> DSM 2601	2.15	2.29	2.28	2.17
4.	<i>L. plantarum</i> ssp. <i>argentoratensis</i> DSM 16365	1.87	2.01	2.03	1.89
5.	<i>L. pentosus</i> DSM 20314	1.93	1.94	1.90	1.85
6.	<i>L. paraplantarum</i> DSM 10667	1.66	1.98	1.76	1.75

Проведенное исследование обосновало достоверность и воспроизводимость результатов идентификации микроорганизмов с помощью время-пролётной масс-спектрометрии и показало целесообразность ее внедрения в практику типирования для видовой идентификации ряда грамположительных молочнокислых бактерий. Результаты исследований показывают, что группа бактерий *Lactobacillus plantarum*, основанные на профилях MALDI-TOFMS, коррелируют с филогенетическими генными группами *pheS16SrRNA*. При этом метод MALDI-TOFMS оказался наиболее эффективным и достоверным, быстрым и экономичным способом видовой идентификации природных молочнокислых бактерий.

### Заключение

Таким образом, таксономическую идентификацию чистых культур молочнокислых бактерий, выделенных из различных природных субстратов (надземная часть бобовых культур), целесообразно проводить с привлечением микробиологических и молекулярно-генетических методов. Такой комплексный подход позволяет идентифицировать штаммы по совокупности описанных признаков на видовом уровне, что в дальнейшем обеспечивает создание на их основе эффективных биологических консервантов с прогнозируемыми биотехнологическими свойствами.

### Список литературы

1. Азаров В.Н. Основы микробиологии и санитарии: учебник. – М., 1986. – 207 с.
2. Беспоместных К.В. [и др.] Конструирование родоспецифичных и видоспецифичных праймеров для индикации и идентификации *Lactobacillus bulgaricus* // Техника и технология пищевых производств. – 2010. – Т.16. – №1. – С.64– 68.
3. ГОСТ 10444.11-2013. Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Метод выявления и подсчета количества мезофильных молочнокислых микроорганизмов. – М., 2014. – 24 с.
4. Лукашов В.В. Молекулярная эволюция и филогенетический анализ. – М., 2009. – 256 с.
5. Методы бактериологии / под ред. Ф. Герхарда. – М., 1983. – Т.1. – 254 с.
6. Определитель бактерий Берги / под ред. Хоулта Дж. и др. – М., 1997. – С.303–309.

7. Припутневич Т.В. Оптимизация микробиологической диагностики оппортунистических инфекций у беременных и новорожденных на основе протеометрических и молекулярно-генетических методов: дис. ... д-ра мед. наук. – М., 2014. – 293 с.
8. Чуканов Н.К., Попенко А.К. Микробиология консервирования трудносилосуемых растений. – Алма-Ата, 1986. – 197 с.
9. Шевцов А.Б. [и др.] Идентификация фенотипически и генетически близких видов *Lactobacillus* на основе анализа нуклеотидной последовательности генов *16SrRNA*, *groEL*, *rpoB*, *VirpI* // Микробиология. – 2011. – Т.80. – №5. – С.659–668.
10. Шендеров Б. А. Современное состояние и перспективы развития концепции. Пробиотики, пребиотики и синбиотики // Пищевые ингредиенты. Сырье и материалы. – 2005. – № 2. – С.23–26.
11. Axelsson L.T. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In: Lactic Acid Bacteria. Microbiology and Functional Aspects. – New York, 1998. – P.1–72.
12. Claesson M.J., van Sinderen D., O'Toole P.W. The genus *Lactobacillus* – a genomic basis for understanding its diversity // FEMS Microbiol. Let. – 2007. – Vol. 269.– P.22–28.
13. Kandler O., Weiss N., Sneath P.H.A. et al. Regular, non-sporing gram-positive rods. In: Bergley's Manual of Systematic Bacteriology. – Baltimore, 1986. – Vol.2. – P. 1208–1234.
14. Kozaki M., Uchimura T., Okada S. Experimental manual of lactic acid bacteria. – Tokyo, 1992. – P.34–37.
15. Man J.C., Rogosa M., Sharpe M.E. A medium for the cultivation of lactobacilli // J. Appl. Bacteriol. – 1960.– Vol.23. – P.130–135.
16. Naser S.M., Thompson F.L., Hoste B. et al. Application of multilocus sequence analysis (MLSA) for rapid identification of *Enterococcus* species based on *rpoA* and *pheS* genes // Microbiology. – 2005. – Vol.151. – P.2141–2150.
17. Naser S.M., Dawyndt P., Hoste B. et al. Identification of lactobacilli by *pheS* and *rpoA* gene sequence analyses // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2007.– Vol.57. – P.2777–2789.
18. Rogosa M., Mitchell J.A, Wiesman R.F. A selective medium for isolation and enumeration of oral and fecal lactobacilli // J. Appl. Bacteriol. – 1951. – Vol.62. – P.132–133.
19. Soro-Yao A.A., Schumann P., Thonart P. et al. The Use of MALDI-TOF mass spectrometry, ribotyping and phenotypic tests to identify lactic acid bacteria from fermented cereal foods in Abidjan (Côte d'Ivoire) // J. Open Microbiol. – 2014. – Vol.8. – P.78–86.
20. Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A. et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study // J. Bacteriol. – 1991. – Vol. 173. – № 2. – P.697–703.

**Рецензенты:**

Хайруллин Р.М., д.б.н., профессор, главный научный сотрудник ФГБУН Института биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, г. Уфа;

Дегтярева И.А., д.б.н., заведующий отделом агроэкологии и микробиологии ФГБНУ «Татарский научно-исследовательский институт агрохимии и почвоведения», г. Казань.