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 штам віднесено до виду *Bacillus subtilis*. Однак, жирнокислотний профіль клітинних стінок штаму представлений переважно розгалуженими похідними ізо- та антиізо- 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 штам віднесено до виду *Bacillus amyloliquefaciens*.

Ключові слова: штам *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 штам *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, саліцин, 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.

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 грампозитивні

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 NO₃ 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	цитрату	–	+	+
	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 штам 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 °C. 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- C₁₅ та C₁₇), 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 % C₁₆ жирних кислот, кількість C₁₇ майже не відрізнялася. Слід зазначити, що C_{18:2} жирні кислоти у клітинній стінці штаму *B. amyloliquefaciens* IMB B-7525 відсутні, однак кількість C₁₈ спо-

Таблиця 2.
Жиринокислотний 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 ₁₄	1,43	0,42	1,6
iC _{15:0}	13,22	6,25	20,6
aiC _{15:0}	31,47	29,4	44,10
C ₁₅	0,11	0	0
iC _{16:0}	6,13	4,12	2,4
C ₁₆	9,96	9,90	5,7
iC _{17:0}	18,17	19,60	10,9
aiC ₁₇	16,27	24,00	15,8
C ₁₇	0,15	0,17	0
C _{18:2}	0,24	0	0
C ₁₈	1,70	4,54	0

Примітка: *B. subtilis* CCUG 10779 (дані отримані з web-ресурсу 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 штамами 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	Г	С	Г	Г	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 B-5044, UCM B-5113, <i>Bacillus</i> sp. 1.1	Г	С	Г	Г	С	Г	Г	А	С
<i>B. amyloliquefaciens</i> FZB42 алелі С, D, E, H та I; ' <i>B. velezensis</i> ' C6-1 та 1-3; UCM B-5139 та UCM B-5051	Г	Т	Г	Г	С	А	Г	А	С
' <i>B. velezensis</i> ' CR-502T	Г	Т	Г	А	С	А	Г	А	С
<i>B. atrophaeus</i> DSM 7264T; <i>B. vallismortis</i> BCRC 17183	С	Т	А	Г	С	А	Г	А	С
<i>B. atrophaeus</i> ATCC51189, GBSC56, LSSC22; <i>B. vallismortis</i> DSM 11031T	С	Т	А	Г	Т	А	Г	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 ^T ATCC 6633 алелі А й В	С	Т	А	Г	Т	А	А	Г	Т
<i>B. mojavensis</i> DSM 9205T; <i>Bacillus</i> sp. UCM B-5051	С	Т	А	Г	С	А	А	Г	Т
<i>B. subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> B-5014	С	Т	А	А	Т	А	А	Г	Т
<i>B. subtilis</i> ssp. <i>subtilis</i> DSM 10 ^T та 168 алелі В, D, G, H, W; <i>B. subtilis</i> UCM B-5184	Г	Т	А	Г	С	А	А	Г	Т
<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> 168 алелі Е й І <i>B. subtilis</i> UCM B-5049	Г	Т	А	Г	Т	А	А	Г	Т
<i>B. subtilis</i> 168 алель А	Г	Т	А	Г	С	Г	А	Г	Т
<i>B. subtilis</i> 168 алель С	Г	Т	А	Г	С	Г	Г	Г	Т
<i>B. subtilis</i> 168 алель J	Г	Т	А	Г	Т	А	Г	Г	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. Зеленая, 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 полифазный таксономический анализ каротинсинтезирующего штамма *Bacillus* sp. 1.1, перспективного для создания пробиотика. На основе культурально-морфологических и физиолого-биохимических признаков исследуемый штамм отнесен к виду *Bacillus subtilis*. Несмотря на это, жирнокислотный профиль клеточных стенок штамма представлен преимущественно разветвленными производными изо- и антиизо- C_{15:0} и C_{17:0} соединений (более 70 %), что характерно для вида *Bacillus amyloliquefaciens*. На основе нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК, а также профиля полиморфных нуклеотидов штамм отнесен к виду *Bacillus amyloliquefaciens*.

Ключевые слова: штамм *Bacillus* sp., полифазный таксономический анализ.

**O.O. Nechypurenko, M.A. Kharhota, L.B. Zelena,
A.M. Ostapchuk, L.V. Avdeeva**

*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. Перелыгин // 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 Infect. – 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