

## ФІЛОГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ ШТАМУ *BACILLUS SUBTILIS* IFBG МК-2 ТА ПРОДУКУВАННЯ РИБОФЛАВІНУ ЙОГО ІНДУКОВАНИМИ КЛОНАМИ

М.М. РАДЧЕНКО<sup>1</sup>, О.О. ТІГУНОВА<sup>1</sup>, Л.Б. ЗЕЛЕНА<sup>2</sup>, Н.Є. БЕЙКО<sup>1</sup>, Г.С. АНДРІЯШ<sup>1</sup>, С.М. ШУЛЬГА<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Інститут харчової біотехнології і геноміки НАН України, Київ, Україна, Осиповського 2а, 04123

<sup>2</sup> Інститут мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Київ, Україна, вул. Академіка Заболотного, 154, 03143

E-mail: Shulga5@i.ua

Метою роботи було дослідження філогенетичних взаємозв'язків нового штаму-продуценту *Bacillus subtilis* IFBG МК-2 з вже існуючими штамми і підвищення біосинтетичної активності цього продуценту шляхом мутагенезу. В результаті сиквенування 16S рРНК штаму IFBG МК-2 отримано фрагменти цього гена, сумарною довжиною 1305 нуклеотидів. Проведено філогенетичний аналіз і побудовано дендрограму на основі нуклеотидних послідовностей гена 16S рРНК з використанням методу зв'язування найближчих сусідів і двопараметричної моделі Кімури. Виявлено, що відсоток подібності між сумарним сиквенуваним фрагментом гена 16S рРНК штаму IFBG МК-2 і депонованою у GenBank послідовністю цього гена типового штаму *B. subtilis* IAM 12118 становить 99 %. За результатами філогенетичного аналізу штаму IFBG МК-2 ідентифіковано як *B. subtilis*. Шляхом індукованого мутагенезу з використанням УФ-опромінення і послідовною ступінчастою селекцією одержано мутантний клон *B. subtilis* IFBG МК-1А з підвищеною на 50 % продукцією рибофлавіну у порівнянні з вихідним штамом.

**Ключові слова:** *Bacillus subtilis*, рибофлавін, мутагенез, філогенез, УФ-опромінення, штам-продуцент.

**Вступ.** Одним із методів одержання вітамінів є мікробіологічний синтез. В промисловому виробництві питання економічного споживання вуглецевого субстрату, зниження витрат в процесі культивування, а також максимально повна трансформація субстрату у цільові метаболіти є особливо актуальними (Wang, 2019; Liu, 2020; Suwannasom, 2020). В останні роки в селекції штамів-продуцентів вітамінів активно почали використовувати методи генної інженерії, завдяки чому можна збільшувати кількість генів біосинтезу вітамінів шляхом клонування у плазмідах, а також методи індукованого мутагенезу і штучного відбору (Boretsky, 2002; Gingichashvili, 2020).

Унікальні біосинтетичні властивості мають бактерії виду *Bacillus subtilis*. Ці мікроорганізми активно використовують як пробіотики (Amin, 2020; Хуе, 2020; Zanghari, 2020), крім того вони синтезують низку метаболітів – ферментів, вітамінів, амінокислот (Karlov, 2020; Saleh, 2020; Zhang, 2020). Бактерії виду *B. subtilis* широко використовують як об'єкт молекулярно-генетичних досліджень та створення генно-інженерних конструкцій. Штами *B. subtilis* мають високий ступінь толерантності, і їх культивування може відбуватись в широкому діапазоні значень температури, рН та інших технологічних параметрів (Karlov, 2020).

Практично всі сучасні комерційні штами-продуценти рибофлавіну та флавонових нуклеотидів були отримані за допомогою метаболічної інженерії і надекспресії структурних та регуляторних генів біосинтетичного шляху рибофлавіну, а також генів, що беруть участь у надвиробництві попередника рибофлавіну – гуанідин трифосфату (Abbas, 2011). У штаммах *B. subtilis* з надпродукцією рибофлавіну було виділено три групи ферментів циклу асиміляційного азоту (глутамат-синтази (ГТС), глутамінові синтази (ГС) та глутаматдегідрогенази (ГД)) і встановлено, що активність ГС була практично однаковою, активність ГД була відсутня, а активність ГТФ – знижена (Gershanovich, 2011). Штами не мали активності транскетоксилази, ключового ферменту циклу пентозофосфатів, але характеризувались нормальною активністю рибозози-5-фосфат-епімерази та глюкозофосфат-ізомерази. Тенденція до збільшення швидкості накопичення рибофлавіну у мутантів була пов'язана з пригніченням активності ГТС (Abbas, 2011).

Метою даної роботи було дослідження філогенетичних взаємовідносин нового штаму-продуценту з існуючими штамми-продуцента-

ми *B. subtilis* і підвищення біосинтетичної активності продуцента шляхом мутагенезу.

**Матеріали і методи.** Об'єктом дослідження був штам *B. subtilis* ІМВ В-7797 (IFBG МК-2) з «Колекції штамів мікроорганізмів та ліній рослин для харчової і сільськогосподарської біотехнології» ДУ «Інститут харчової біотехнології і геноміки НАН України» (Radchenko, 2019). Культуру зберігали у пробірках зі скошеним L-агаром.

Для вирощування штамів-продуцентів рибофлавіну використовували середовища (Radchenko, 2019). Культивування проводили протягом 24 год в шейкері-інкубаторі BIOSANES-20 (Латвія) за температури  $38 \pm 1$  °C і за швидкості 240 об/хв. Ріст штамів-продуцентів рибофлавіну на твердих живильних середовищах оцінювали за методикою (Ge, 2020). Цитологічні дослідження проводили за допомогою мікроскопу «Laboval 4» («Carl Zeiss», ФРН). Фотографії робили за допомогою фотоапарату «Canon Power Shot A640» (Японія).

Для ідентифікації штаму геномну ДНК виділяли з добової бактеріальної культури з використанням набору GeneJet Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific) відповідно до рекомендацій виробника. Ампліфікацію гена 16S рРНК проводили з праймерами 27f і 1492g (Lane, 1991), використовуючи ампліфікатор «Mastercycler Personal 5332» («Eppendorf», США). Реакційна суміш містила 2× DreamTaq PCR Master Mix (Thermo Scientific), 30 pmol кожного з праймерів, 50 ng ДНК. Температурний режим ПЛР був наступним: початкова денатурація – 95 °C, 2 хв; 30 циклів – 95 °C, 30 с; 55 °C, 45 с; 72 °C, 1хв 30 с; кінцева елонгація – 72 °C, 7 хв. Очищення отриманого ПЛР-продукту проводили використовуючи GeneJet PCR Purification Kit (Thermo Scientific). Концентрацію ДНК визначали за допомогою спектрофотометра DS-11 FX+ («DeNovix», США). Очищений ПЛР-продукт сиквенували у двох напрямках на приладі «Genetic Analyzer 3130» («Applied Biosystems», США) з використанням набору реактивів «Big Dye 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 нукле-

отидних послідовностей 16S рРНК представників різних видів роду *Bacillus* здійснювали за допомогою програми MEGA 6 (Tamura, 2013). Дендрограму філогенетичних зв'язків будували за допомогою методу найближчого зв'язування (Neighbor Joining) з використанням двопараметричної моделі Кімури за 1000 реплікам бутстреп-аналізу. Послідовності гена 16S рРНК типових культур бактерій роду *Bacillus* взяті з бази даних GenBank.

Для визначення впливу УФ-опромінення на мікроорганізми використовували популяції на однаковій стадії життєвого циклу (спороутворення). Суспензію опромінювали (лампа БУФ-30,  $\lambda = 257$  нм) протягом різних проміжків часу – від 1 до 30 хв (1, 3, 5, 10, 15, 20, 25 та 30 хв). Контролем слугували неопромінені суспензії спор.

Готували суспензію спор у стерильній воді (титр  $\sim 10^6$  спор в 1 см<sup>3</sup>). Суспензію центрифугували (5 хв, 7 тис об/хв). Супернатант зливали, спори ресуспендували в розчині NaCl (5 г/дм<sup>3</sup>). Потім суспензію ( $\sim 10$  см<sup>3</sup>) заливали в чашку Петрі, ставили чашку під УФ-лампу на відстані 20 см, відкривали чашку та постійно перемішуючи опромінювали суспензію. Після опромінення відбирали пробу з чашки і розсівали враховуючи процент життєздатних клітин. Для оцінки результатів опромінення, клони, які залишились життєздатними за максимальної дози опромінення відсівали для подальшого аналізу.

Статистичну обробку результатів було виконано за допомогою програми Microsoft Excel. Усі дослідні проводили в трьох повтореннях. Різницю між двома середніми величинами вважали достовірною за  $P < 0,05$ .

**Результати і обговорення.** Першим кроком для удосконалення нових штамів-продуцентів є видова ідентифікація цих штамів (Franco-Duarte, 2019). Для встановлення таксономічного положення штаму IFBG МК-2 було проведено сиквенування фрагменту гена 16S рРНК за методикою (Andriiash, 2014) та пошук гомологічної послідовності у базі даних GenBank за допомогою програми BLAST. У результаті сиквенування фрагменту гена 16S рРНК штаму IFBG МК-2 було отримано фрагменти цього гена, сумарна довжина яких склала 1305 нуклеотидів. (табл. 1). Сиквенувані послідовності гена 16S рРНК штаму *B. subtilis* IFBG МК-2

було зареєстровано в базі даних GenBank за реєстраційними номерами МК880455 і МК880456. Отримані послідовності наведено нижче:

**МК880455**

1 agaaatggcg gcgtgctata catgcagtcg  
 agcggacaga tgggagcttg ctccctgatg  
 61 ttagcggcgg acgggtgagt aacacgtggg  
 taacctgcct gtaagactgg gataactccg  
 121 ggaaccggg gctaataccg gatggttgtt  
 tgaaccgcat ggttcaaaaca taaaagggtg  
 181 cttcggctac cacttacaga tggaccgcg  
 gcgcattagc tagttggtga ggtaacggct  
 241 caccaaggca acgatgcgta gccgacctga  
 gagggtgatc ggccacactg ggactgagac  
 301 acggcccaga ctctacggg aggcagcagt  
 agggaatctt ccgcaatgga cgaaagtctg  
 361 acggagcaac gccgcgtgag tgatgaagg  
 tttcggatcg taaagctctg ttgttaggga  
 421 agaacaagta ccgttcgaat agggcggtac  
 cttgacggta cctaaccaga aagccacggc  
 481 ttactacgtg ccagcagccg cggtaatacg  
 taggtggcaa gcgttgccg gaattattgg  
 541 gcgtaaaggc ctcgcaagcg gtttcttag  
 tctgatgtga aagcccccg ctcaaccggg  
 601 gagggtcatt ggaaactggg gaacttgagt  
 gcagaagagg agagtggaat tccc

**МК880456**

1 ggggggtttc cgccccttag tgctgcagct  
 aacgcattaa gcattccgcc tggggagtac  
 61 ggtcgcaaga ctgaaactca aaggaattga  
 cgggggcccg cacaagcggg ggagcatgtg  
 121 gttaattcga aagcaacgca aagaacctta  
 ccaggctctg acatcctctg acaatcctag  
 181 agataggacg tccccttcgg gggcagagtg  
 acaggtggtg catggttgc gtcagctcgt  
 241 gtcgtgagat gttgggttaa gtcccgaac  
 gagcgcgaacc cttgatctta gttgccagca  
 301 ttcagttggg cactctaagg tgactgccg  
 tgacaaaaccg gaggaagggtg gggatgacgt  
 361 saaatcatca tgccccttat gacctgggct  
 acacacgtgc tacaatggac agaacaagg  
 421 gcagcgaaac cgcgaggta agccaatccc  
 acaaatctgt tctcagttcg gatcgcagtc

481 tgcaactcga ctgcgtgaag ctggaatcgc  
 tagtaatcgc ggatcagcat gccgcgggta  
 541 atacgttccc gggccttgta cacaccgccc  
 gtcacaccac gagagttgtt aacacccgaa  
 601 gtcgggtgagg taacctttta ggagccagcc  
 gccgaagggtg ggacagatga t

Максимальний рівень схожості нуклеотидних послідовностей (99 %) було виявлено між сиквенованими фрагментами гена 16S рРНК штаму IFBG МК-2 та послідовністю цього гена типового штаму *B. subtilis* IAM 12118.

Для встановлення філогенетичних взаємовідносин між *B. subtilis* IFBG МК-2 та типовими представниками роду *Bacillus* здійснено філогенетичний аналіз і побудовано дендрограму на основі нуклеотидних послідовностей гена 16S рРНК з використанням методу зв'язування найближчих сусідів і двопараметричної моделі Кімури (рис.1). Отримані результати підтвердили належність штаму IFBG МК-2 до виду *B. subtilis*. Таким чином, за допомогою молекулярно-генетичного аналізу послідовності гена 16S рРНК штаму IFBG МК-2 встановлено, що виділений штам належить до виду *B. subtilis*.

Одним із методів одержання нових штамів мікроорганізмів з підвищеною продуктивністю є селекція мутантних клонів (Moshin, 2017; Asia, 2018; Cortesao, 2019). Спонтанні мутанти бактерій зазвичай виявляють з частотою  $1 \times (10^{-6} - 10^{-8})$ . Можна суттєво збільшити цю частоту, обробивши клітини мутагенами. Мутагени індують мутації у дозах, які одночасно спричиняють летальний ефект.

Види бактерій, а також штами одного виду можуть різнитися за чутливістю до мутагенів. Передусім, необхідно було встановити, як впливають різні дози УФ опромінення на виживання спор. Оскільки УФ опромінення – відносно слабкий мутагенний фактор, найкращі результати отримують за виживання від 0,1 до 1,0 %. Необхідно також максимально зменшити ефект фотореактивації. Для цього необхідно жорстко підтримувати умови УФ опромінення

Таблиця 1. Склад нуклеотидів 16S рРНК

Довжина	GC	A	C	G	T
1305	92 (7%)	288 (22,1 %)	380 (29,1 %)	339 (26,0 %)	298 (22,8 %)

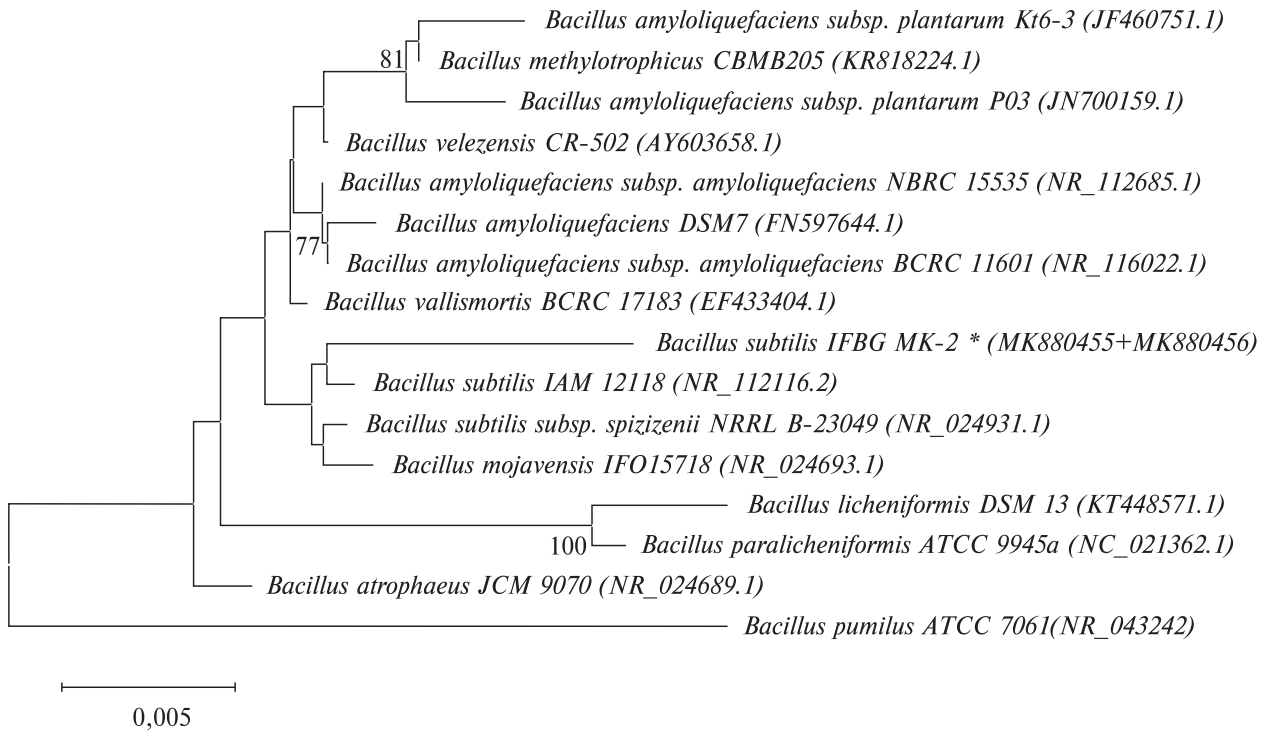


Рис. 1. Дендрограма генетичної подібності між штамом *B. subtilis* IFBG МК-2 та типовими штамми роду *Bacillus*

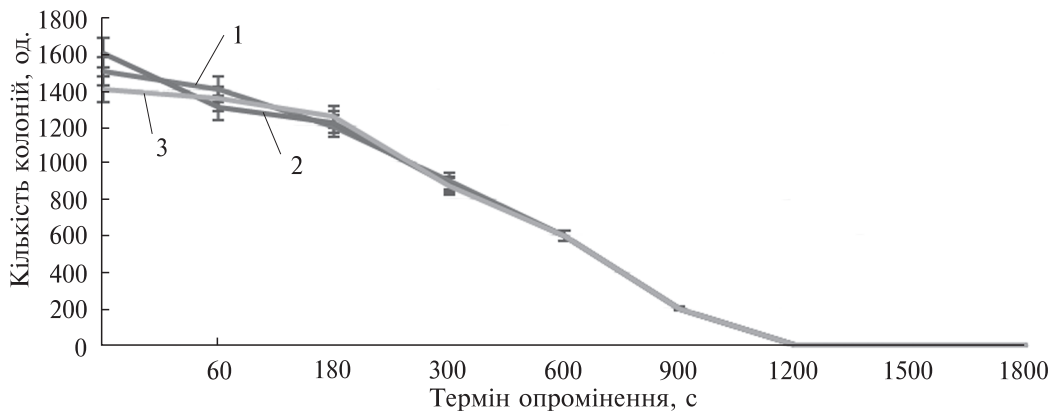
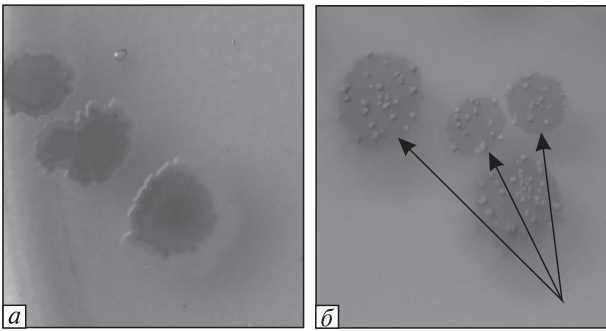


Рис. 2. Кількість колоній культури *B. subtilis* IFBG МК-2 за дії УФ-опромінення

(без домішок видимого світла) та проводити подальше вирощування бактерій у повній темряві. Залежність кількості колоній культури *B. subtilis* від тривалості опромінення представлена на рис. 2. Умови досліду (відстань між УФ-лампою та поверхнею чашки з культурами, їх фізіологічний стан, хімічний склад та рН середовища) були незмінними, тому біологічні ефекти від опромінення залежали лише від

тривалості опромінення. Для *B. subtilis* тривалість опромінення, що призводило до LD<sub>50</sub> (доза, що зумовлює виживання 50 % клітин), становило 7 хв. Найбільший мутагенний ефект у дозах, за яких виживання клітин становило від 0,1 до 1 % ( гине 99,0–99,9 %) був за тривалості опромінення 20 хв.

Після висівання живих клітин на агаризоване середовище було отримано 1869 колоній



**Рис. 3.** Колонії культури *B. subtilis* IFBG МК-2 (а) вихідні та (б) після УФ опромінення. Стрілками позначено кристали рибофлавіну

бактерій. Усі колонії було проаналізовано, відмічено особливості росту, форму колонії та її край, розмір забарвленої зони навколо колонії та її розміри, порівняно з колоніями вихідної культури. Показано, що кількість колоній, які мали відміну від вихідного штаму, збільшувалась лінійно зі збільшенням дози УФ-опромінення (в нашому випадку до 20 хв). Подальше збільшення тривалості опромінення (до 25–30 хв) не супроводжувалось зміною життєздатності.

Після визначення летальної дози опромінення у *B. subtilis* IFBG МК-2 і розсіву на повноцінне середовище, з найбільшого розведення ( $10^{-7}$ ) було відібрано 5 колоній (табл. 2), які відрізнялись за морфологічними ознаками. Такі колонії були менші за розміром, мали коричневе забарвлення з візуально видимими кристалами рибофлавіну на поверхні (рис. 3).

Колонії з морфологічними відмінностями було відсіяно і перевірено на накопичення рибофлавіну (рис. 4, а). За результатами дослідження видно, що найбільше накопичення рибофлавіну було у клону 3. Відібрані спори було повторно опромінено впродовж 20 хв із

**Таблиця 2.** Життєздатність бактеріальної культури після опромінення

Розведення	Вихідна культура	Опрмінена культура	
		Життєздатні колонії	Мутантні колонії
$10^{-6}$	$1450 \pm 0,23$	$580 \pm 0,9$	$49 \pm 0,3$
$10^{-7}$	$150 \pm 0,23$	$60 \pm 0,9$	$5 \pm 0,3$

збереженням всіх експериментальних умов, описаних вище. Отримані чотири колонії, які вирости на чашках Петрі після опромінення, культивували впродовж 48 год. Отримані спори обробляли за допомогою УФ-лампи в такому ж режимі, що і на першому етапі. Рівень накопичення рибофлавіну у відібраних клонів представлено на рис. 4, б. Як видно з рисунка, найбільше накопичення рибофлавіну було за культивування клону 4.

Використовуючи відібраний клон було проведено процедуру з опромінення як і для перших двох етапів. За результатами дослідження було отримано три колонії (рис. 4, в). Отримані колонії було перевірено на здатність накопичувати рибофлавін у культуральній рідині в порівнянні з вихідним штамом. Показано, що найбільше накопичення рибофлавіну було за культивування клону 1 та становило  $9,6 \text{ г/дм}^3$ . З отриманою культурою було проведено ще два етапи опромінення з наступним послідовним селективним відбором і отримано дві колонії (клони № 1 і № 1А) та визначено накопичення рибофлавіну (рис. 4, г).

За рівнем накопичення рибофлавіну клони 1 та 1А майже не відрізнялись. Концентрація рибофлавіну була  $13,98$  і  $13,85 \text{ г/дм}^3$ , відповідно. Культуру пересівали на тверде та рідке середовища з наступним визначенням морфологічних ознак і накопичення рибофлавіну протягом двох місяців (з інтервалом два тижні). Морфологічні ознаки культури залишались незмінними, а накопичення рибофлавіну під час пересіву було майже однаковим (в межах від  $13,87$  до  $13,98 \text{ г/дм}^3$ ), що свідчить про стабільність мутантних клонів.

В результаті дії УФ-опромінення на спори *B. subtilis* було отримано мутантний штам *B. subtilis* IFBG МК-1А, який за морфологічними ознаками і біосинтетичною активністю відрізнявся від вихідної культури.

Накопичення рибофлавіну штамом-продуцентом IFBG МК-1А ( $14 \text{ г/дм}^3$ ) можна порівняти з результатами накопичення рибофлавіну ( $16\text{--}24 \text{ г/дм}^3$ ) рекомбінантними штамми надпродуцентами (Debabov, 1981; Schallmey, 2004). Зокрема, штам ВКПМ В 6797 з використанням рекомбінантної плазмиди рМХ30ribO186, яка мала рибофлавіновий оперон з порушеною негативною регуляцією, накопичував  $14,2 \text{ г/дм}^3$

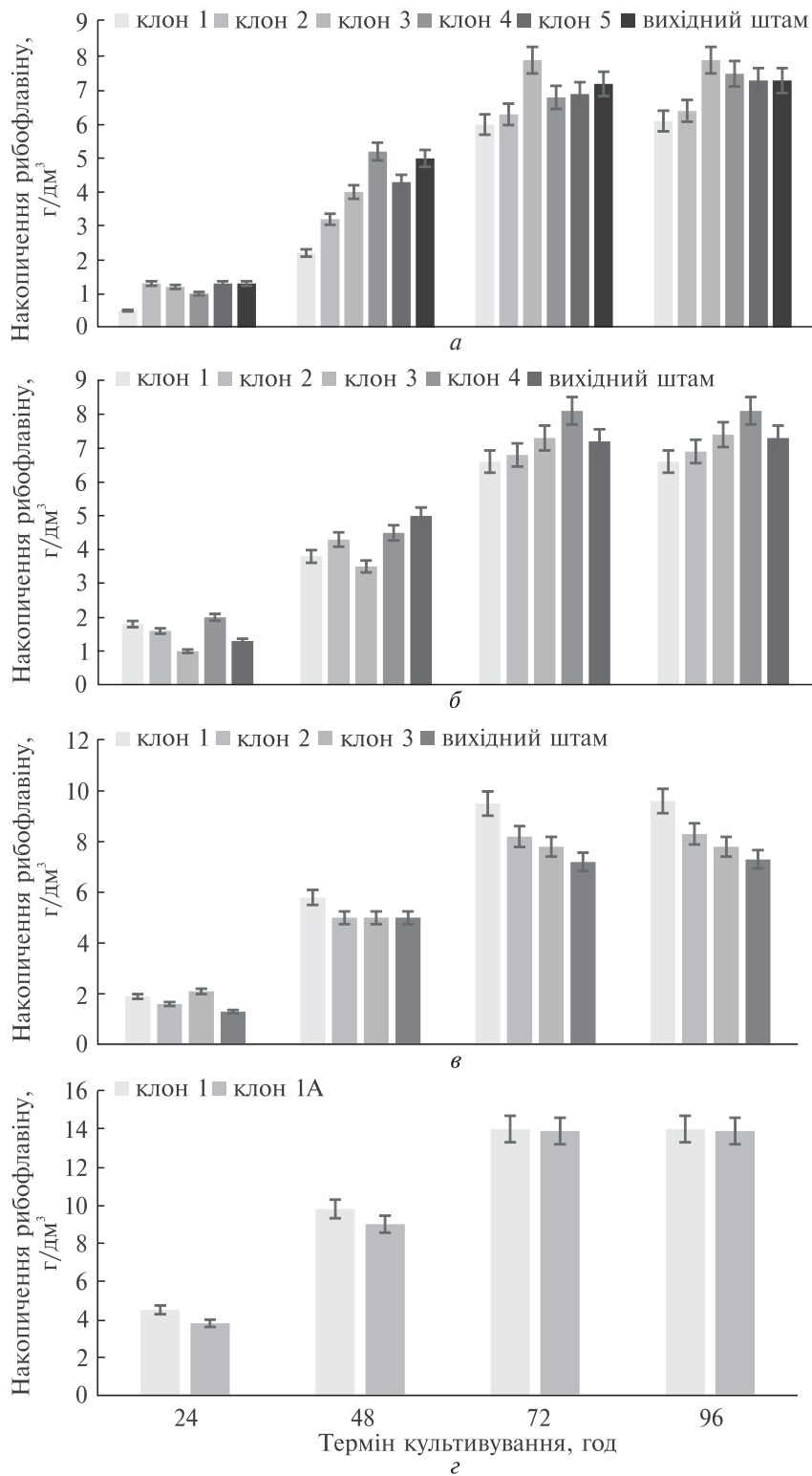


Рис. 4. Накопичення рибофлавіну клонами після опромінення

за 48 год культивування (Debabov, 1981; Schallmey, 2004).

Таким чином, результати дослідження 16S рРНК штаму IFBG МК-2 свідчать про те, що штам відноситься до виду *B. subtilis*. Шляхом індукованого мутагенезу з використанням УФ-опромінення і послідовним ступінчастим відбором одержано стійкий мутантний штам *B. subtilis* IFBG МК-1А, який продукував рибофлавін майже на 50 % більше (13,98 г/дм<sup>3</sup>) в порівнянні з вихідним штамом (8,9 г/дм<sup>3</sup>). Отриманий штам *B. subtilis* IFBG МК-1А може бути в подальшому використаний для створення на його основі генетично модифікованого штаму надсинтезу рибофлавіну.

**Дотримання етичних стандартів.** Ця стаття не містить результатів будь-яких досліджень з використанням людей і тварин в якості об'єктів.  
**Конфлікт інтересів.** Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

**Фінансування.** Дослідження було профінансовано за рахунок відомчої тематики «Створення штамів надпродуцентів вторинних метаболітів (амінокислот, спиртів, вітамінів)». Державний реєстраційний номер 0119U101489.

#### PHYLOGENETIC ANALYSIS OF THE STRAIN *BACILLUS SUBTILIS* IFBG МК-2 AND PRODUCTION OF RIBOFLAVIN BY ITS INDUCED CLONES

М.М. Radchenko, О.О. Tigonova, Л.В. Zelena, N.Ye. Beiko, H.S. Andriiash, S.M. Shulga

SE Institute for Food Biotechnology and Genomics of National Academy of Sciences of Ukraine, 2a, Osyovskoho str., Kyiv, Ukraine, 04123  
Danylo Zabolotny Institute of Microbiology and Virology National Academy of Sciences of Ukraine, 154, Akademika Zabolotnogo str., Kyiv, Ukraine, 03143  
E-mail: Shulga5@i.ua

The aim of this work was to study the phylogenetic relationships of the new producer strain *Bacillus subtilis* IFBG МК-2 with existing strains and to increase the producer's biosynthetic activity by mutagenesis. Sequencing of the 16S rRNA of the IFBG МК-2 strain resulted in fragments of this gene with a total length of 1305 nucleotides. Phylogenetic analysis was performed and a dendrogram was constructed based on the nucleotide sequences of the 16S rRNA gene using the Neighbour joining method and the two-parameter Kimura model. It was shown that the similarity of

sequenced fragments of 16S rRNA of strain IFBG МК-2 with fragments of deposited in GenBank sequence of this gene of a typical strain *B. subtilis* IAM 12118 was 99 %. According to the results of phylogenetic analysis, the IFBG strain МК-2 was identified as *B. subtilis*. Using the method of induced mutagenesis using UV radiation and sequential stepwise selection of clones, a mutant clone of *B. subtilis* IFBG МК-1А was obtained with a 50 % increase in the accumulation of riboflavin compared to the original strain.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Abbas CA, Sibirny AA (2011) Genetic control of biosynthesis and transport of riboflavin and flavin nucleotides and construction of robust biotechnological producers. *Microbiol Mol Biol Rev.* doi: 10.1128/MMBR.00030-10
- Amin FAZ, Sabri S, Ismail M et al (2020) Probiotic properties of *Bacillus* strains isolated from stingless bee (*Heterotrigona itama*) honey collected across Malaysia. *Int J Environ Res Public Health.* doi: 10.3390/ijerph17010278
- Andriiash GS, Zabolotna GM, Bondarenko VS et al (2014) Gene 16s rRNA sequence phylogenetic analysis of lysine producers strains. *Biotechnologia Acta.* doi: 10.15407/biotech7.06.040 (In Ukrainian)
- Asia L, Mohsin I, Muhammad A (2018) Ethyl methane sulfonate chemical mutagenesis of *Bacillus subtilis* for enhanced production of protease *Org Med Chem IJ.* doi: 10.19080/OMCIJ.2018.05.555664
- Boretsky YuR, Petryshyn A, Krieger K et al (2002) Cloning and expression of a gene encoding riboflavin synthase of yeast *Pichia guilliermondii*. *Tsitol Genet* 36(4):3–7
- Cortesro M et al (2019) *Bacillus subtilis* spore resistance to simulated Mars surface conditions. *Front Microbiol* doi: 10.3389/fmicb.2019.00333
- Debabov VG (1981) The industrial use of Bacilli. In: *The Molecular Biology of the Bacilli*, USA, New York, p. 331–371
- Franco-Duarte R et al (2019) Advances in chemical and biological methods to identify microorganisms— from past to present. *Microorganisms* doi: 10.3390/microorganisms7050130
- Ge Y-Y et al (2020) Screening and spontaneous mutation of pickle-derived *Lactobacillus plantarum* with overproduction of riboflavin, Related Mechanism, and Food Application. *Foods* <https://doi.org/10.3390/foods9010088>
- Gershanovich VN et al (2000) Transketolase mutation in riboflavin-synthesizing strains of *Bacillus subtilis*. *Mol Gen Mikrobiol Virusol* 3:3–7 (In Russian).
- Gingichashvili S, Duanis-Assaf D, Shemesh M et al (2020) The adaptive morphology of *Bacillus subtilis*

- biofilms: a defense mechanism against bacterial starvation. *Microorganisms*. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8010062>
- Karpov DS, Domashin AI, Kotlov MI et al (2020) Biotechnological potential of the *Bacillus subtilis* 20 strain. *Mol Biol*. <https://doi.org/10.1134/S0026893320010082>
- Lane DJ (1991) 16S/23S rRNA sequencing, In E. Stackebrandt and M. Goodfellow (ed.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley & Sons, New York, p. 115–175
- Liu S, Hu W, Wang Z (2020) Production of riboflavin and related cofactors by biotechnological processes. *Microb Cell Fact*. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01302-7>
- Mohsin I, Muhammad A, Fareeha B (2017) Development of *Bacillus subtilis* mutants for overproduction of protease *J Microb Biochem Technol*. doi: 10.4172/1948-5948.1000363
- Radchenko MM et al (2019) Isolation and identification of a strain producing riboflavin. *Fakt eksperim evol organiz*. <https://doi.org/10.7124/FEEO.v24.1094> (In Ukrainian)
- Saleh AA, Dawood MM, Badawi NA et al (2020) Effect of supplemental serine-protease from *Bacillus licheniformis* on growth performance and physiological change of broiler chickens. *J Appl Animal Res*. 1080/09712119.2020.1732986
- Schallmeyer M, Singh A, Ward OP (2004) Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Can J Microbiol*. <https://doi.org/10.1139/W03-076>
- Suwannasom N, Kao I, Pruß A et al (2020) Riboflavin: The health benefits of a forgotten natural vitamin. *Int J Mol Sci*. <https://doi.org/10.3390/ijms21030950>
- Tamura K, Stecher G, Peterson D (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol*. doi: 10.1093/molbev/mst197
- Wang J, Wang W, Wang H et al (2019) Improvement of stress tolerance and riboflavin production of *Bacillus subtilis* by introduction of heat shock proteins from thermophilic bacillus strains. *Appl Microbiol Biotechnol*. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09788-x>
- Xue F, Sampredo-Torres-Quevedo C, Arnaouteli S et al (2020) Probiotic *Bacillus subtilis* protects against  $\alpha$ -synuclein aggregation in *C. elegans*. *Cell Repts*. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.12.078>
- Zaghari M, Sarani P, Hajati H (2020) Comparison of two probiotic preparations on growth performance, intestinal microbiota, nutrient digestibility and cytokine gene expression in broiler chickens. *J Appl Animal Res*. 1080/09712119.2020.1754218
- Zhang C, Wu D, Ren H (2020) Economical production of vitamin K<sub>2</sub> using crude glycerol from the by-product of biodiesel. *Sci Rep*. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62737-x>

Надійшла в редакцію 01.07.20  
Після доопрацювання 27.10.20  
Прийнята до друку 18.03.21