

Пирог, Т.П. Образование поверхностно-активных веществ при росте штамма *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1 на гидрофильных и гидрофобных субстратах / Т. П. Пирог, Т. А. Шевчук, И. Н. Волошина, Е. В. Карпенко // Прикладная биохимия и микробиология. – 2005. – Т. 40, № 5 . – С. 544–550.

УДК 759.873.088.5:661.185

## ОБРАЗОВАНИЕ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ПРИ РОСТЕ ШТАММА *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1 НА ГИДРОФИЛЬНЫХ И ГИДРОФОБНЫХ СУБСТРАТАХ

Т.П.Пирог<sup>1,2</sup>, Т.А.Шевчук<sup>2</sup>, И.Н.Волошина<sup>1</sup>, Карпенко Е.В.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> – Национальный университет пищевых технологий, 01033, Киев;

<sup>2</sup> – Институт микробиологии и вирусологии Национальной академии наук Украины, 03143, Киев,

<sup>3</sup> – Отделение физико-химии и технологии горючих ископаемых Института физической химии Национальной академии наук Украины, 79053, Львов  
e-mail [tapirog@usuft.kiev.ua](mailto:tapirog@usuft.kiev.ua)

Изучена способность к образованию поверхностно-активных веществ (ПАВ) при росте штамма *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1 на гидрофильных (этанол, глюкоза) и гидрофобных (жидкие парафины, гексадекан) субстратах. Установлено, что штамм синтезирует как свободные, так и ассоциированные с клетками ПАВ, обладающие эмульгирующими и поверхностно-активными свойствами. Показана зависимость синтеза ПАВ от состава питательной среды, природы и концентрации углеродного и азотного источников питания, длительности процесса культивирования.

По химической природе ПАВ, синтезируемые при росте *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1 на этаноле, представляют комплекс липидов с соединениями полисахаридно-белковой природы. В составе липидов выявлены гликолипиды (трегалозомоно- и трегалозодикориномиколаты) и общие липиды (цетиловый спирт, пальмитиновая кислота, метиловый эфир н-пентадекановой кислоты, триглицерид, миколовые кислоты).

В течение последних 20-30 лет микробные поверхностно-активные вещества (биоПАВ, биосурфактанты) являются объектом интенсивных теоретических и прикладных исследований, что обусловлено их возможным практическим использованием в нефте- и горнодобывающей, химической, фармацевтической, пищевой промышленности, сельском хозяйстве, а также для очистки окружающей среды. Микробные ПАВ по своей эффективности не уступают синтетическим, а такое их преимущество как биodeградебельность и нетоксичность делает их особенно перспективными для создания новых экологически безопасных технологий.

Из загрязненных нефтью образцов почвы и воды нами были выделены нефтеокисляющие бактерии, идентифицированные как *Acinetobacter calcoaceticus* К-4, *Nocardia vaceinii* К-8, *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1, *Mycobacterium sp.*К-2 [1]. Установлена возможность очистки воды от низких концентраций нефти (100 мг/л) иммобилизованными на керамзите клетками *Rh. erythropolis* ЭК-1 и *N. vaceinii* К-8. Показана зависимость степени очистки воды от скорости ее подачи, уровня аэрации и наличия биогенных добавок (источников азота и фосфора). Эффективность очистки воды от нефти иммобилизованными клетками *Rh. erythropolis* ЭК-1 при высокой скорости протока воды (до 0,68 л/ч), низкой аэрации (до 0,1 л/л в мин) и периодической подаче 0,01% диаммонийфосфата составляла 99,5-99,8%.

Известно, что способность к ассимиляции углеводородных субстратов у микроорганизмов часто обусловлена синтезом ПАВ [2-6]. В связи с этим настоящая работа посвящена изучению образования поверхностно-активных веществ штаммом *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1. В задачу исследований входило: 1) исследовать синтез ПАВ при культивировании *Rh. erythropolis* ЭК-1 на гидрофобных и гидрофильных субстратах; 2) изучить некоторые физико-химические свойства ПАВ; 3) исследовать возможность повышения синтеза ПАВ штаммом *Rh. erythropolis* ЭК-1.

## МЕТОДИКА

**Культивирование *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1.** Бактерии выращивали на жидких минеральных средах следующего состава (г/л): **Среда А:**  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 6,8;  $\text{NaOH}$  - 1,0;  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  - 0,6;  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,4;  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$  - 0,1;  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,001, pH 6,8-7,0. **Среда Б:**  $\text{KNO}_3$  - 1,0;  $\text{NaCl}$  - 1,0;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  - 0,6;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 0,14;  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,1, pH 6,8-7,0. В качестве источника углерода и энергии использовали этанол в концентрации 1 и 2% (по объему); жидкие парафины (*n*-алканы  $\text{C}_{10}$ - $\text{C}_{16}$ ) - 0,5 и 1% (по объему); гексадекан - 1 и 2% (по объему), а также глюкозу - 1% (масс.). В одном из вариантов  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  в среде А был заменен на  $\text{KNO}_3$  (1,0 и 1,5 г/л).

Культивирование бактерий осуществляли в колбах на качалке (220 об/мин) при  $30^\circ\text{C}$  в течение 48-168 ч.

В качестве посевного материала использовали двухсуточную культуру, выращенную на глюкозо-картофельном агаре.

Биомассу определяли по оптической плотности клеточной суспензии с последующим пересчетом на сухую массу клеток по калибровочному графику, а также весовым методом.

**Определение показателей синтеза ПАВ.** Способность к синтезу ПАВ оценивали за следующими показателями:

1) поверхностное ( $\sigma_s$ ) натяжение свободной от клеток культуральной жидкости, которое измеряли с помощью платиновой и стеклянной пластинки по методу Вильгельми [7];

2) относительная концентрация ПАВ, оценку которой проводили в единицах CMD (critical micelle delution). Для определения значения CMD измеряли поверхностное натяжение ряда последовательных разведений свободной от клеток культуральной жидкости и по полученным данным строили график зависимости  $\sigma_s$  от значения разведения. Абсцисса точки перегиба кривой соответствует значению CMD [8];

3) эмульгирующая активность, которую определяли по методу, описанному в работе [9]. В качестве субстратов для эмульгирования использовали

вазелиновое масло, подсолнечное масло, легкую нефть (плотность  $0,80 \text{ г/см}^3$ ) и гексадекан. К 5 мл исследуемого раствора, содержащего ПАВ (культуральная жидкость, супернатант культуральной жидкости, клеточная суспензия), добавляли 5 мл эмульгируемого субстрата и встряхивали в течение 2 мин. Измерение индекса эмульгирования ( $E_{24}$ ) определяли через 24 ч как величину отношения высоты эмульсионного слоя к общей высоте жидкости в пробирке и выражали в процентах. Для получения супернатанта культуральной жидкости ее центрифугировали при 5000 g в течение 20 мин. Клеточную суспензию получали при суспендировании осадка клеток в дистиллированной воде, объем которой был равен объему исходной культуральной жидкости, из которой были осаждены клетки;

4) нефтеотмывающие свойства культуральной жидкости, супернатанта культуральной жидкости и клеточной суспензии. Для оценки нефтеотмывающих свойств на стеклянную пластинку (4 x 2 см) наносили тонкий слой тяжелой нефти (плотность  $0,99 \text{ г/см}^3$ ), стеклянную пластинку опускали на 1 ч в исследуемый раствор, содержащий ПАВ, после чего определяли площадь чистой, отмытой от нефти, поверхности стекла. Нефтеотмывающие свойства рассчитывали как отношение площади отмытого от нефти стекла к общей площади и выражали в процентах;

5) содержание углеводов в культуральной жидкости, которое анализировали по реакции с фенолом и серной кислотой [10]. Выбор этого показателя для количественного определения ПАВ был обусловлен тем, что, согласно литературным данным, родококки синтезируют гликолипиды, в частности, трегалозолипиды [2-4];

6) содержание общих липидов в культуральной жидкости, которое определяли весовым методом после экстракции смесью Фолча (хлороформ: метанол = 2:1), с последующим упариванием растворителя в вакууме ( $40^0\text{C}$ ).

**Определение химического состава липидов.** Липиды экстрагировали из культуральной жидкости, супернатанта культуральной жидкости и клеточной суспензии смесью хлороформ : метанол = 2:1. Качественный анализ липидов

проводили методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинках DC-Alufohlen Kieselgel 60 (“Merck”) в системах растворителей:

- **полярная система** - хлороформ : метанол : вода = 85:15:1;
- **неполярная система I** – гексан : диэтиловый эфир = 2:1;
- **неполярная система II** - гексан : диэтиловый эфир : уксусная кислота = 90:10:1.

Идентификацию липидов осуществляли путем окрашивания пластинок спиртовым раствором фосфорномолибденовой кислоты и парами иода (общие липиды), раствором нингидрина (пептидолипиды), анисовым альдегидом и антроновым реактивом (гликолипиды) [11].

**Определение химического состава внеклеточных ПАВ.** Внеклеточные сурфактанты выделяли также следующим образом. Культуральную жидкость центрифугировали (5000 g, 20 мин) для отделения клеток родококков. Полученный супернатант диализовали против дистиллированной воды в течение 3 сут, затем концентрировали в вакууме (40<sup>0</sup>С). В полученном концентрате анализировали содержание нейтральных моносахаридов, уроновых кислот, суммарного белка и жирных кислот.

Для определения нейтральных моносахаридов и уроновых кислот концентрат гидролизовали в запаянных ампулах с 2 N трифторуксусной кислотой в течение 2,5 ч при 121<sup>0</sup>С. Содержание нейтральных моносахаридов и уроновых кислот определяли с помощью углеводного анализатора “Biotronik LC-2000” (колонка 0,38 x 12,5 см; смола Dionex Ax8-II) в 0,5 M Na-боратном буфере (pH 8,0) при 60<sup>0</sup>С и 0,04 M фосфатном буфере (pH 2.4) при 70<sup>0</sup>С соответственно, детектировали при 570 нм после реакции с 2,2<sup>1</sup>-бицинхонинатом меди.

Суммарный белок определяли на аминокислотном анализаторе “Biotronik LC-2000” (колонка 0,4 x 22 см; смола Ostion LG AN) в Na-боратно-цитратном буфере при 80<sup>0</sup>С после гидролиза 4 N HCl (16 ч, 100<sup>0</sup>С). Детектировали при 570 нм после реакции с нингидрином.

Метилвые эфиры жирных кислот определяли после гидролиза 2 N трифторуксусной кислотой с последующим метанолизом 0,5 N HCl в метаноле (2

ч, 80<sup>0</sup>С) на газо-жидкостном хроматографе “Hewlett-Packard 5890” с пламенно-ионизационным детектором и стеклянной капиллярной колонкой (0,2 мм х 25 м) с фазой OV-1.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Бактерии рода *Rhododoccus* синтезируют поверхностно-активные липиды в ответ на присутствие *n*-алканов в среде культивирования [2, 3, 12, 14]. ПАВ родококков представляют собой гликолипиды, в частности трегалозолипиды (трегалозомоно- и трегалозодикориномиколаты). Физиологическая роль ПАВ при росте родококков на углеводородах состоит в солюбилизации гидрофобных субстратов в клетках. Так, например, поверхностное натяжение супернатанта культуральной жидкости, полученной после выращивания *Rh.erythropolis* AP-25 на гексадекане, составляет 30,3 мН/м, а при росте на глюкозе - около 50 мН/м [13]. В составе ПАВ, синтезируемых на глюкозе, отсутствовал трегалозомонокориномиколат, и спектр липидов был значительно беднее, чем при росте на гексадекане [13].

Количество ПАВ, синтезируемых родококками на гидрофобных субстратах, колеблется в широких пределах (от 0,5 до 30 г/л) и зависит от концентрации источника углерода, соотношения углерод/азот, природы источника азотного питания, значения рН, концентрации растворенного кислорода и ряда других факторов [2, 3, 12]. При периодическом культивировании родококков в колбах на среде, содержащей 2% гексадекана, синтезируется, как правило, 1-3 г/л ПАВ.

Наши эксперименты показали, что количество ПАВ, образуемых штаммом *Rh.erythropolis* ЭК-1, составляет от 0,2 до 1,65 г/л (данные фенол-серного метода) и зависит от состава среды, природы и концентрации источника углерода и длительности культивирования (табл. 1). Наиболее низкие значения поверхностного натяжения (30-39 мН/м) и высокие значения CMD (2,5-6,0) были отмечены для супернатанта культуральной жидкости, полученной после выращивания бактерий на гидрофобных субстратах (гексадекан, жидкие парафины). На гидрофильных субстратах (этанол, глюкоза) показатель  $\sigma_s$

повышался до 50-55 мН/м, а CMD снижался до 1,1-1,2. Максимальное количество ПАВ (до 1,65 г/л) отмечено при выращивании бактерий на гексадекане (табл. 1).

Однако более высокий индекс эмульгирования культуральной жидкости в присутствии вазелинового и подсолнечного масла (60-88%) отмечался при росте штамма *Rh.erythropolis* ЭК-1 на этаноле и глюкозе, а на гидрофобных субстратах составлял 23-56% (табл. 1 и 2). Следует также отметить, что способность к эмульгированию гексадекана была установлена только для культуральной жидкости, полученной после культивирования бактерий на этаноле.

Снижение эмульгирующей активности культуральной жидкости после отделения клеток (индекс эмульгирования супернатанта культуральной жидкости, табл. 2) может свидетельствовать о том, что часть ПАВ, синтезируемых *Rh.erythropolis* ЭК-1, связана с клетками. В литературе отмечается, что ПАВ, синтезируемые родококками, преимущественно ассоциированы с клетками, и только незначительная их часть выделяется во внешнюю среду [2, 3].

Наличие достаточно высокой эмульгирующей активности как культуральной жидкости, так и супернатанта, при росте *Rh.erythropolis* ЭК-1 на этаноле оказалось неожиданным, так как известно, что культуральная жидкость после выращивания родококков на гидрофильных субстратах (глюкозе) не обладает эмульгирующими свойствами [13]. Следует также отметить, что супернатант и культуральная жидкость после культивирования *Rh.erythropolis* ЭК-1 как на гидрофобных, так и на гидрофильных субстратах обладали нефтеотмывающими свойствами (40-90%).

Анализируя представленные выше данные (табл. 1 и 2), мы предположили, что при росте на всех исследуемых субстратах *Rh.erythropolis* ЭК-1 синтезирует комплекс веществ, обладающих эмульгирующими и поверхностно-активными свойствами. Причем на гидрофильных субстратах синтезируется преимущественно эмульгатор, о чем свидетельствовал более высокий индекс эмульгирования, а на гидрофобных – преобладает образование веществ с поверхностно-активными свойствами, что подтверждалось более низким значением  $\sigma_s$  и более высоким CMD в таких условиях.

В дальнейших экспериментах бактерии выращивали на среде А с этанолом. Выбор таких условий культивирования был обусловлен следующими причинами.

1. В литературе отсутствуют данные о синтезе ПАВ родококками при росте на этаноле.

2. На среде А количество синтезированных ПАВ выше, чем на среде Б (табл.1).

3. При выращивании *Rh.erythropolis* ЭК-1 на среде А с этанолом образуется гомогенная культуральная жидкость (без конгломератов клеток и их налипания на стенки колбы), что существенно облегчает практическое ее использование.

4. При культивировании на среде с этанолом наблюдается снижение рН до 5-5,5, в то время как для синтеза ПАВ оптимальным, как правило, является значение рН, близкое к нейтральному [4, 15, 16]. Таким образом, существуют потенциальные резервы для увеличения синтеза ПАВ штаммом *Rh.erythropolis* ЭК-1 на этом субстрате.

Дальнейшие наши исследования были посвящены интенсификации синтеза ПАВ при выращивании *Rh.erythropolis* ЭК-1 на среде А с этанолом. Эксперименты показали, что замена нитратно-аммонийного источника азота в ростовой среде на эквимолярную по азоту концентрацию нитратного источника (1 г/л  $KNO_3$ ) сопровождалась стабилизацией рН в процессе культивирования на уровне 6,4-6,5; при этом показатель СМД увеличивался до 1,3, а количество ПАВ - в 1,5 раза (данные экстракции смесью хлороформа и метанола), хотя уровень углеводов оставался на том же уровне (табл. 3). Очевидно, увеличение синтеза ПАВ обусловлено поддержанием рН на уровне, близком к нейтральному, в результате ассимиляции бактериями нитратного источника азота. Из литературы известно, что именно такой уровень рН является оптимальным для большинства продуцентов ПАВ [4, 15, 16]. Кроме того, для синтеза ПАВ большое значение имеет соотношение углерод/азот в среде культивирования [4, 15, 17]. Наши эксперименты показали, что повышение концентрации этанола до 2%,  $KNO_3$  до

1,5 г/л, увеличение длительности культивирования до 7 сут позволило повысить количество ПАВ до 1,2 г/л, содержание углеводов до 1,8 г/л, а СМД до 3,3 (табл. 3). Культуральная жидкость, полученная в таких условиях культивирования, характеризовалась высоким индексом эмульгирования (85%), который оставался на уровне 60% при разбавлении культуральной жидкости в 50 раз. Интересно отметить, что при разбавлении культуральной жидкости усиливались ее нефтеотмывающие свойства. Такая закономерность была установлена и для культуральной жидкости, полученной в других условиях культивирования на среде с этанолом (табл. 3).

На следующем этапе исследовали химический состав липидов, синтезируемых *Rh. erythropolis* ЭК-1 на этаноле. Из данных табл. 4 видно, что все исследуемые образцы культуральной жидкости и супернатанта характеризовались наличием трегалозомоно- и трегалозодикориномиколатов. Оказалось интересным, что трегалозомиколаты не были выявлены (или регистрировались в следовых количествах) в составе ассоциированных с клетками ПАВ, в то время как их наличие характерно для клеточных ПАВ родококков. Мы полагаем, что это явление можно объяснить тем, что *Rh. erythropolis* ЭК-1 выращивали на гидрофильном субстрате – этаноле, а трегалозомиколаты облегчают потребление гидрофобных соединений и, как правило, содержатся в клеточных стенках при культивировании на парафинах, нефти, гексадекане и др. [2, 3].

Качественный состав общих липидов был одинаковым для культуральной жидкости и клеток (табл. 4). Следует отметить появление в составе ПАВ, экстрагируемых из культуральной жидкости и клеток, выращенных на среде с  $\text{KNO}_3$ , триглицерида и миколовых кислот. Однако эти соединения не были выявлены в соответствующих супернатантах культуральной жидкости. Данные изучения химического состава липидов подтвердили наше предположение о том, что *Rh. erythropolis* ЭК-1 синтезирует как свободные, так и внеклеточные ПАВ,

При измерении поверхностно-активных свойств фракции липидов, экстрагированных из культуральной жидкости после выращивания бактерий на среде с 2% этанола и 1,5 г/л  $\text{KNO}_3$ , были установлены значения  $\sigma_s = 40$  мН/м и

$CMD = 4,3$  (для культуральной жидкости они составляли 50 мН/м и 3,3 соответственно). Следует отметить, что липиды (после экстракции и высушивания) практически не растворялись в воде и 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,0). Их удалось растворить (причем не полностью) только при подщелачивании раствора до рН 9,0. Кроме того, при экстракции культуральной жидкости смесью хлороформа и метанола в большинстве случаев наблюдали образование очень устойчивой эмульсии. Наличие такой эмульсионной фазы и трудности перевода органического экстракта в раствор могут свидетельствовать о том, что липиды образуют комплекс с другими соединениями (например, белковой и/или полисахаридной природы). Это предположение было подтверждено как окраской хроматограмм нингидрином, так и анализом внеклеточного ПАВ (способ получения указан в разделе “Методика”). В составе таких образцов были обнаружены нейтральные моносахариды и глюкуроновая кислота (табл. 5), а также белок (3,4%) и жирные кислоты, идентифицированные как  $C_{16}$ ,  $C_{18}$ ,  $C_{20}$ ,  $C_{22}$  и далее ряд пиков, повторяющихся через равные промежутки времени.

Приведенные выше данные подтверждают наше предположение о том, что *Rh.erythropolis* ЭК-1 при росте на этаноле синтезирует комплекс веществ, обладающих поверхностно-активными и эмульгирующими свойствами (условно “ПАВ” и “эмульгатор”). При извлечении липидов из культуральной жидкости смесью хлороформа и метанола в органический экстракт переходит также часть “эмульгатора”, равно как и в эмульсионную фазу переходит часть “ПАВ”. В этом случае определение количества липидов путем их экстракции органическими растворителями является неточным и дает заниженные результаты. Заниженными являются и данные содержания углеводов в культуральной жидкости (как “ПАВ”, так и “эмульгатор” содержат в своем составе лишь часть углеводов). Очевидно, наиболее подходящими методами, позволяющими корректно оценить содержание синтезируемых *Rh.erythropolis* ЭК-1 “ПАВ” и “эмульгатора”, являются показатели  $CMD$  культуральной жидкости и ее индекс эмульгирования, определяемый для ряда последовательных разведений.

Таким образом, в результате проведенной работы установлено, что при росте на различных углеродных субстратах *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1 синтезирует комплекс свободных и ассоциированных с клетками биосурфактантов, обладающих поверхностно-активными и эмульгирующими свойствами. При выращивании штамма на гидрофильных субстратах синтезируется преимущественно эмульгатор, а на гидрофобных – вещества с поверхностно-активными свойствами. Установлены условия культивирования штамма на среде с этанолом (природа и концентрация источника азота, концентрация этанола, длительность процесса), позволяющие в три раза повысить количество образуемых биосурфактантов. В составе синтезируемых на этаноле ПАВ выявлены глико- и общие липиды, которые образуют комплекс с соединениями полисахаридно-белковой природы.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Волошина И.Н., Грегирчак Н.Н. // Прикладная биохимия и микробиология. 2003 (В печати).
2. Lang S., Philp J.C. // Antonie van Leeuwenhoek. 1998. 74. P. 59-70.
3. Rosenberg E., Ron E.Z. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1999. 52. P. 154-162.
4. Desai J.D., Banat I.M. // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 1997. 61. N 1. P. 47-64.
5. Bouchez-Naitali M., Rakatozafy H., Marchal R., Leveau J.Y., Vandecasteele J.P. // J. Appl. Microbiol. 1999. 86. N 3. P. 421-428.
6. Ron E.Z., Rosenberg E. // Curr. Opin. Biotechnol. 2002. 13. N 3. P. 249-252.
7. Абрамзон А.А., Зайченко Л.П., Райнгольд С.И. Поверхностно-активные вещества. Синтез, анализ, применение. Л.: Химия, 1988. 200 с.
8. Guerra-Santos Z., Kappeli O., Fiechter A. // Appl. Environ. Microbiol. 1984. 48, N 2. P. 301-305.
9. Cooper D.C., Goldenger B.G. // Appl. Environ. Microbiol. 1987. 53, N 2. P. 224-229.
10. Dubois M., Gilles K., Hamilton J., Rebers P., Smith F. // Anal. Chem. 1956. V.28, N 3. P.350-356.
11. Addo S., Saito M. Chromatography lipid biomedical research and chemical diagnostic. Amsterdam: Elsevier, 1987. 266 p.
12. Kuyukina M.S., Ivchina I.B., Philp J.C. et al. // J. Microbiol. Methods. 2001. 46. P. 149-156.
13. Шульга А.Н., Карпенко Е.В., Елисеев С.А. и др. // Микробиология. 1990. 59, № 3. С. 443-447.

14. *Philp J.C., Kuyukina M.S., Ivshina I.B., Dunbar S.A., Christofi N., Lang S., Wray V.* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2002. 59. N 2-3. P. 318-324.
15. *Mata-Sandoval J.C., Karns J., Torrents A.* // *Microbiol. Res.* 2001. 155. N 4. P. 249-256.
16. *Турковская О.В., Дмитриева Т.В., Муратова А.Ю.* // *Прикладная биохимия и микробиология.* 2001. 37. № 1. С. 80-85.
17. *Santa Anna L.M., Sebastian G.V., Pereria N.Jr., Alves T.L., Menezes E.P., Freire D.M.* // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2001. 91-93. P. 459-467.