

Д.Р. Абдулина, Л.М. Пуриш, Г.А. Иутинская

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Заболотного, 154, Киев, Д 03680 МСП, Украина

ВОЗМОЖНОСТЬ ПЕРЕНОСА ПЛАЗМИД В БАКТЕРИИ – КОМПОНЕНТЫ СУЛЬФИДОГЕННОГО МИКРОБНОГО СООБЩЕСТВА

В клетках аммонифицирующих и железовосстанавливающих бактерий – компонентов природного сульфидогенного микробного сообщества выявлены внехромосомные генетические элементы размером от 5 до 9 тысяч пар нуклеотидов (т.п.н.). Получены трансконъюганты бактерий: *Pseudomonas aeruginosa* 27, *P. aeruginosa* 28, *P. mendocina* 29, *Aeromonas hydrophila/caviae* 30, несущие плазмиды RP4 и R68.45. Изучены частота переноса и стабильность наследования плазмид у полученных трансконъюгантов. Самыми восприимчивыми к плазмиде R68.45 оказались штаммы *P. mendocina* 29 и *P. aeruginosa* 27, в которые она переносилась с частотой $3,0 \cdot 10^{-6}$ и $2,4 \cdot 10^{-7}$ на клетку реципиента, соответственно. Штаммы бактерий *P. aeruginosa* 27(R68.45), *P. aeruginosa* 27(RP4), *P. mendocina* 29(R68.45), *A. hydrophila/caviae* 30(RP4), *A. hydrophila/caviae* 30(R68.45) стабильно наследовали плазмиды RP4 и R68.45.

Таким образом, экспериментально доказана возможность переноса и удерживания генетических элементов типа плазмиды бактериями сульфидогенного микробного сообщества при конъюгационном скреживании их с бактериями других видов, несущими плазмиды.

Ключевые слова: сульфидогенное микробное сообщество, плазмиды, трансконъюгация, частота переноса.

Функционирующее сульфидогенное сообщество, взаимодействуя с металлом, становится фактором его микробной коррозии. Оптимальной формой жизнедеятельности данного сообщества является биопленка, которая, как правило, образовывается на поверхности металла [6, 14]. В сульфидогенном сообществе преобладают сульфатвосстанавливающие, железовосстанавливающие, денитрифицирующие, аммонифицирующие бактерии, которые взаимодействуют между собой. Обмен информацией в сообществе между участниками происходит посредством ряда сигнальных молекул или генетическим путем по разнообразным механизмам [12, 13, 23]. Тесный контакт клеток в биопленке предполагает, что одним из механизмов обмена генетической информацией является конъюгация [15].

В литературных источниках есть данные о существовании горизонтального переноса плазмид между микроорганизмами, развивающимися в водных экосистемах [9], в почвах [2] и других экотопах [13, 21]. Известны единичные сообщения о выделении из сульфатвосстанавливающих бактерий малых плазмид, большая часть которых – криптические [10, 20]. Так, был сконструирован вектор на основе плазмиды, выделенной из *Desulfovibrio desulfuricans* G100A для интродукции клонированной ДНК в данную группу бактерий [20]. Показана также возможность трансформации плазмид в сульфидогенное сообщество, функционирующее на поверхности металла [22]. Однако, наличие, распространение и возможность обмена генетической информацией с помощью плазмид между бактериями в сульфидогенном сообществе остаются мало изученными.

Учитывая вышесказанное, целью нашей работы было выявление внехромосомных генетических элементов, а именно плазмид, среди бактерий – компонентов сульфидогенных микробных сообществ и исследование возможности переноса мобильных генетических элементов в бактерии этих сообществ.

Материалы и методы. Объектами исследования были:

- бактерии *Desulfovibrio* sp. 10, *Pseudomonas aeruginosa* 27, *P. aeruginosa* 28, *P. mendocina* 29, *Aeromonas hydrophila/caviae* 30, выделенные и идентифицированные нами ранее из коррозионно-агрессивного сульфидогенного микробного сообщества и хранящиеся в коллекции отдела общей и почвенной микробиологии Института микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины [1, 19];

- изоляты бактерий выделенные из почвы, прилегающей к газопроводу «Союз» (Карпаты): изолят К1 сульфатвосстанавливающей бактерии (СВБ), изоляты 46, 47, 48, 59 – железоз-

© Д.Р. Абдулина, Л.М. Пуриш, Г.А. Иутинская, 2013

восстанавливающих (ЖВБ), изоляты 51, 56 – денитрифицирующих (ДНБ), изоляты 41-45, 52, 54 – аммонифицирующих бактерий (АБ).

- референс-штаммы для выявления наличия и установления размеров плазмид: *Erwinia carotovora* 48А с плазмидой рСА25 размером 9,8 т.п.н. [7], и *Esherichia coli* CR63(F) с плазмидой 100 т.п.н.;

- донорные штаммы *E. coli* J53, содержащие самотрансмиссионные плазмиды RP4 и R68.45 размером 60 т.п.н. использовали для трансконъюгационного скрещивания. Штаммы бактерий, несущие плазмиды, предоставлены д.б.н. Товкачем Ф.И. из коллекции отдела молекулярной генетики бактериофагов ИМВ НАНУ.

Для выделения плазмидной ДНК сульфатвосстанавливающие бактерии культивировали в микроаэрофильных условиях в жидкой питательной среде Постгейта «В» в течение 7 суток при температуре 28°C [6]. Аммонифицирующие, денитрифицирующие, железовосстанавливающие бактерии выращивали в течение 24-36 ч на жидкой среде LB при температуре 28°C до выхода на позднюю фазу стационарного роста. Штаммы *E. coli* J53(RP4), *E. coli* J53(R68.45) культивировали при температуре 37°C в жидкой среде LB с канамицином (40мкг/мл), а штамм *E. coli* CR63(F) - без внесения антибиотика.

Для выделения плазмидной ДНК биомассу бактерий отделяли от культуральной жидкости на центрифуге с ротором 5415R (Eppendorf) в режиме 10-12 тыс. об/мин, 5 мин при температуре 4°C.

Экстракцию плазмидной ДНК из клеток бактерий проводили тремя методами: щелочным методом Кадо и Ли [16], методом Лау и Крикмора [18], а также с помощью стандартного набора для выделения плазмид GeneJet (Fermentas, Литва).

К полученным плазмидным препаратам добавляли 7,5 мкл красителя ($\text{Na}_2\text{ЭДТА}$ – 0,1 мМ, бромфеноловый синий – 0,2 %, глицерин – 7%) [4]. Наличие плазмидной ДНК анализировали методом электрофоретического разделения в 0,8%-м агарозном геле в 1хТАЕ-буфере (40мМ Трис, 2мМ ЭДТА, 20мМ ацетата натрия, рН 8,0), при напряженности поля 6 В/см. Для визуализации ДНК использовали 1%-й раствор этидий бромид. Результаты документировали в ультрафиолетовом свете с помощью системы гель-документации INGENIUS LHR (Syngene, США).

Трансконъюгацию проводили между донорными клетками *E. coli* J53, несущими плазмиды RP4, R68.45 и реципиентными бактериями *P. aeruginosa* 27, *P. aeruginosa* 28, *P. mendocina* 29, *A. hydrophila/caviae* 30.

Предварительно проверяли культуры реципиентных бактерий на чувствительность к антибиотикам методом минимальных ингибирующих концентраций на среде NB (Himedia, Индия) с рядом концентраций антибиотиков: ампициллина от 25 до 300 мкг/мл, канамицина от 25 до 200 мкг/мл, тетрациклина от 12,5 до 100 мкг/мл [4].

Конъюгационный перенос плазмид осуществляли по методике, описанной в [5] с модификациями. Культуральные жидкости донорных и реципиентных клеток центрифугировали 5000 об/мин, 20 мин, полученную биомассу отмывали стерильным фосфатным буфером (KH_2PO_4 – 0,29 г/л; K_2HPO_4 – 1,19 г/л, рН 7,6) и переносили в жидкую среду LB. Инкубационная смесь состояла из донорных и реципиентных клеток в соотношении 1:1, с титром $1\text{-}2 \times 10^9$ кл/мл. После инкубации в течение 24 ч при 28°C полученные при скрещиваниях трансконъюганты рассеивали до отдельных колоний на среду Гильтая с экспериментально установленной нами концентрацией тетрациклина для контрселекции донорных клеток.

Частоту переноса плазмид определяли отношением числа трансконъюгантов к общему числу реципиентных клеток. Стабильность наследования плазмид проверяли путем культивирования плазмидосодержащих бактерий в неселективных условиях (на жидкой среде LB без антибиотика), с последующим высевом на селективную среду Гильтая с тетрациклином (40 мкг/мл). Стабильность наследования плазмид проверяли в 500 клонах бактерий и рассчитывали процент плазмидосодержащих клеток.

Результаты и их обсуждение. Развивающиеся в условиях подземной среды сульфидогенные микробные сообщества в основном состоят из бактерий, которые проявляют коррозионную активность [14, 19]. Эти сообщества являются сложными и малоизученными объектами с точки зрения молекулярной генетики, поэтому для выделения плазмидной ДНК было использовано несколько методик, которые позволяют изучить плазмиды разной величины от 2,5

до 100 т.п.н. [16, 18]. Для оценки размера плазмид были использованы F-плазида размером 100 т.п.н. из *E. coli* CR63 и плазида рСА25 размером 9,8 т.п.н. из *E. carotovora* 48A [7, 8].

Внехромосомная ДНК была обнаружена у бактерий природного сульфидогенного сообщества: в изолятах 52, 41 аммонифицирующих (на рис. 1. дорожки 6, 15, 16) и изоляте 46 (дорожка 10) железовосстанавливающей бактерии. В изоляте К1 сульфатвосстанавливающей бактерии внехромосомной ДНК данными методами не выявлено (рис. 1).

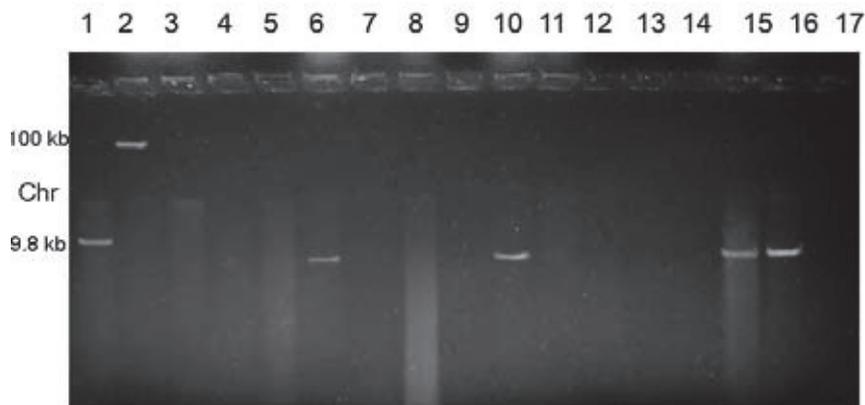


Рис. 1. Электрофореграмма плазмидной ДНК изолятов бактерий природного сульфидогенного микробного сообщества: дорожка 1 – препарат референс-плазмиды рСА25; 2 – препарат референс-плазмиды CR63(F); 3 – изолят 59 ЖВБ; 4 – изолят 56 ДНБ; 5-6 – изоляты 54, 52 АБ; 7 – изолят 51 ДНБ; 8-10 – изоляты 48-46 ЖВБ; 11-14 – изоляты 45, 44, 43, 42 АБ; 15-16 – изолят 41 АБ; 17 - изолят К1 СВБ; Chr – положение ДНК неплазмидного происхождения.

Внехромосомные элементы, обнаруженные у бактерий изучаемого сообщества, были небольших размеров от 5 до 9 т.п.н., которые меньше плазмиды рСА25 (9,8 т.п.н.). Из-за их малого размера можем предположить, что эти внехромосомные элементы скорее всего являются критическими плазмидами. Выяснение этого вопроса представляет интерес для дальнейших исследований.

В исследованных коллекционных штаммах бактерий внехромосомной ДНК не выявлено. Допускаем, что при длительном культивировании коллекционных штаммов бактерий сульфидогенного сообщества в лабораторных условиях, плазмиды могли элиминироваться.

Поскольку внехромосомные элементы обнаруживались в клетках аммонифицирующих и железовосстанавливающих бактерий, мы считаем в дальнейшем необходимым изучение функциональной и экологической роли, которую они могут играть в сообществе. Для определения возможности передачи плазмид и установления их роли в сульфидогенном сообществе нами было проведено трансконъюгационное скрещивание коллекционных штаммов бактерий с бактериями других родов, несущими трансмиссионные плазмиды.

Эффективный конъюгационный перенос плазмид в коллекционные штаммы бактерий достигали путем оптимизации условий проведения скрещивания. Бактериями-донорами были *E. coli* J53, несущие трансмиссивные плазмиды RP4 и R68.45, которые относятся к группе несовместимости Inc-P1 [17]. Эти плазмиды изначально выделенные из бактерий рода *Pseudomonas* способны переноситься в широкий круг грамотрицательных бактерий. Плазмиды содержат гены устойчивости к канамицину (Kan^r), ампициллину (Amp^r) и тетрациклину (Tet^r) [5, 6]. Соответственно, целесообразным было проверить природную чувствительность к вышеуказанным антибиотикам исследуемых бактерий - компонентов сульфидогенного сообщества: *P. aeruginosa* 27, *P. aeruginosa* 28, *P. mendocina* 29, *A. hydrophila/caviae* 30. Указанные штаммы проявили резистентность к ампициллину, канамицину, но оказались чувствительными только к тетрациклину в концентрации 40 мкг/мл.

В результате поиска среды для обеспечения выявления трансконъюгантов определили, что среда Гильтая пригодна для проведения контрсеlections донорных штаммов, поскольку

на ней хорошо росли трансконъюгированные клетки бактерий-реципиентов, и не развивались клетки *E. coli* J53. Подбор условий проведения трансконъюгационного скрещивания позволил выявить и отобрать трансконъюганты бактерий *P. aeruginosa* 27, *P. aeruginosa* 28, *P. mendocina* 29, *A. hydrophila/caviae* 30, несущие плазмиды RP4 и R68.45. Для подтверждения наличия в полученных трансконъюгантах донорных плазмид была выделена плазмидная ДНК из отдельных клонов бактерий. Результаты представлены на электрофореграмме (рис. 2).

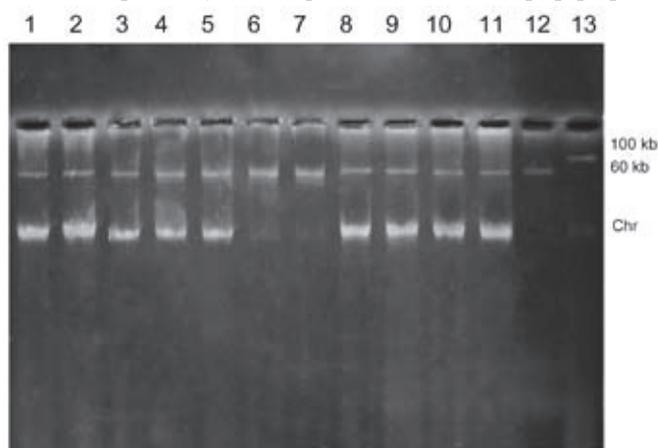


Рис. 2. Электрофореграмма препаратов плазмиды R68.45: дорожки 1-5 отдельные клоны *A. hydrophila/caviae* 30 (R68.45); 6-7 – *P. mendocina* 29 (R68.45); 8-9 – *P. aeruginosa* 28 (R68.45); 10-11 – *P. aeruginosa* 27 (R68.45); 12 – препарат донорной плазмиды R68.45 (60 т.п.н.); 13 – препарат референс-плазмиды CR63(F) (100 т.п.н.), Chr – положение ДНК неплазмидного происхождения.

Полосы, отвечающие фрагментам внехромосомной ДНК, на дорожках 1-11 (рис. 2.) по электрофоретической скорости сопоставимы размеру (60 т.п.н.) донорной трансмиссионной плазмиды (дорожка 12). Это указывает на то, что штаммы бактерий *P. aeruginosa* 27, *P. aeruginosa* 28, *P. mendocina* 29, *A. hydrophila/caviae* 30 содержат внехромосомную ДНК, принадлежащую плазмиде R68.45.

Согласно литературным данным относительно переноса плазмид к представителям бактерий рода *Pseudomonas*, его частота находится в широком диапазоне значений от 10^{-1} до 10^{-9} на клетку реципиента, и зависит от типа плазмидного вектора, вида бактерии-хозяина [3, 9], температурного режима, наличия солей металлов [22], длительности и места проведения скрещивания (био пленка или планктон), соотношения клеток донора и реципиента [2, 9, 11] и прочее.

Нами изучены частотные характеристики переноса и сохранность плазмид бактериями - компонентами сульфидогенного сообщества (табл. 1).

Таблица 1

Характеристики переноса и стабильности наследования плазмид у бактерий-компонентов сульфидогенного микробного сообщества.

Плазмида	Трансконъюгант	Частота переноса, КОЕ/кл реципиента	Стабильность наследования, % бактерий, несущих плазмиду
R68.45	<i>P. aeruginosa</i> 27 (R68.45)	$2,4 \times 10^{-7}$	90
	<i>P. aeruginosa</i> 28 (R68.45)	$8,9 \times 10^{-9}$	0
	<i>P. medoncina</i> 29 (R68.45)	$3,0 \times 10^{-6}$	49
	<i>A. hydrophyla/caviae</i> 30 (R68.45)	$2,0 \times 10^{-9}$	100
RP4	<i>P. aeruginosa</i> 27 (RP4)	$6,06 \times 10^{-9}$	51
	<i>P. aeruginosa</i> 28 (RP4)	$2,5 \times 10^{-9}$	0
	<i>P. medoncina</i> 29 (RP4)	$1,35 \times 10^{-9}$	0
	<i>A. hydrophyla/caviae</i> 30 (RP4)	$3,8 \times 10^{-9}$	100

Примечание: «0» - плазмида потерялась после 1 пассажа на среде без селективного пресса.

Подсчет числа трансконъюгантов позволил установить, что наиболее восприимчивыми к плазмиде R68.45 были клетки *P. mendocina* 29 и *P. aeruginosa* 27. Частота переноса плазмид для данных бактерий составила $3,0 \cdot 10^{-6}$ и $2,4 \cdot 10^{-7}$ на клетку реципиента, соответственно. Перенос плазмиды RP4 оказался менее эффективным, частота переноса этой плазмиды во все исследуемые штаммы была на 2-3 порядка ниже и достигала значения 10^{-9} на клетку реципиента.

Показано, что более высокой степенью стабильности наследования плазмиды R68.45 характеризовались *P. mendocina* 29 (49%), *P. aeruginosa* 27 (90%) и *A. hydrophila/caviae* 30 (100%), а плазида RP4 удерживалась в штаммах *P. aeruginosa* 27 (51%) и *A. hydrophila/caviae* 30 (100%).

В клетках изолятов аммонифицирующих и железовосстанавливающих бактерий природного сульфидогенного сообщества выявлены внехромосомные элементы малого размера. При выяснении возможности трансконъюгационного переноса плазмид в клетки бактерий сульфидогенного сообщества установлено, что самыми восприимчивыми к плазидам RP4 и R68.45 оказались представители родов *Pseudomonas* и *Aeromonas*. Известно, что эти микроорганизмы в условиях подземных конструкций являются одними из составляющих коррозионного сульфидогенного сообщества, первыми колонизируют металлические поверхности и обеспечивают необходимые условия для развития других групп бактерий [1, 19].

Изучение влияния бактерий, несущих трансмиссионные плазмиды, на функционирование сульфидогенного микробного сообщества для выяснения возможности распространения генетической информации может представлять перспективу для дальнейших исследований.

Авторы выражают благодарность Ф.И. Товкачу и Ж.Ю. Сергеевой за оказание консультативной и технической помощи и предоставление плазмидосодержащих штаммов бактерий.

Д.Р. Абдуліна, Л.М. Пуріш, Г.О. Іутинська

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Київ

МОЖЛИВІСТЬ ПЕРЕНОСУ ПЛАЗМІД У БАКТЕРІЇ – КОМПОНЕНТИ СУЛЬФІДОГЕННИХ МІКРОБНИХ УГРУПОВАНЬ

Резюме

У клітинах амоніфікуючих та залізовідновлювальних бактерій – компонентів природного сульфидогенного микробного угруповання виявлено позахромосомні генетичні елементи розміром 5-9 т.п.н.

Отримані транскон'юганти бактерій - компонентів угруповання: *Pseudomonas aeruginosa* 27, *P. aeruginosa* 28, *P. mendocina* 29, *Aeromonas hydrophila/caviae* 30, що несуть плазмиди RP4 та R68.45. Вивчено частоту перенесення та збереження плазмід у отриманих транскон'югантів. Найбільш сприйнятливими до плазмиди R68.45 виявлено штами *P. mendocina* 29 та *P. aeruginosa* 27 з частотами перенесення плазмід $3,0 \cdot 10^{-6}$ та $2,4 \cdot 10^{-7}$ на клітину реципієнта, відповідно. Штами *P. aeruginosa* 27(R68.45), *P. aeruginosa* 27(RP4), *P. mendocina* 29(R68.45), *A. hydrophila/caviae* 30(RP4), *A. hydrophila/caviae* 30(R68.45) стабільно наслідували плазмиди RP4 та R68.45.

Таким чином, експериментально доведено можливість прийняття та утримання генетичних елементів бактеріями сульфидогенного микробного угруповання у вигляді плазмід за допомогою кон'югаційного схрещування із бактеріями інших видів, що несуть плазмиди.

Ключові слова: сульфидогенне микробне угруповання, плазмиди, транскон'югація, частота перенесення.

**POSSIBILITY OF THE PLASMID TRANSFER WITHIN BACTERIA –
COMPOUNDS OF THE SULFIDOGENIC MICROBIAL COMMUNITY**

S u m m a r y

Extrachromosomal elements have been found within the isolates of ammonifying and iron-reducing bacteria obtained from the natural sulfidogenic community. These elements were small with size approximately 5-9 kb.

Transconjugant strains *Pseudomonas aeruginosa* 27, *P. aeruginosa* 28, *P. mendocina* 29, *Aeromonas hydrophila/caviae* 30, harboured plasmids RP4 and R68.45 were obtained. The conjugation rate and retention of the plasmid within transconjugants were studied. *P. mendocina* 29 cells with conjugation rate – $3.0 \cdot 10^{-6}$ CFU/recipient cell, and *P. aeruginosa* 27 with rate $2.4 \cdot 10^{-7}$ CFU/recipient cell were the most susceptible to R68.45 plasmid. The most stable retention is shown for transconjugated strains such as *P. aeruginosa* 27 (R68.45), *P. aeruginosa* 27(RP4), *P. mendocina* 29(R68.45), *A. hydrophila/caviae* 30(RP4), *A. hydrophila/caviae* 30(R68.45).

Thus, it was experimentally shown that corrosive-relevant bacteria form sulfidogenic microbial community which is able to accept extrachromosomal genetic elements from other bacteria when they act as recipients in conjugational process.

The paper is presented in Russian.

Key words: sulfidogenic microbial community, plasmid, transconjugation, conjugation rate.

The author's address: Abdulina D.R., Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, D 03680, MSP, Ukraine.

1. Асаулєнко Л.Г. Абдуліна Д.Р., Пуріш Л.М. Таксономічне положення окремих представників сульфідогенного корозійно-агресивного мікробного угруповання // Мікробіол. журн. – 2010. – 72, № 4. – С. 3–10.
2. Ахметов Л.И., Филонов А.Е., Пунтус И.Ф., Кошелева И.А., Нечаева И.А. Горизонтальный перенос катаболических плазмид в процессе биодеградации нафталина в модельных почвенных системах. // Микробиология. – 2008. – 77, №1. – Р. 29–39.
3. Василенко С.Л., Титок М.А. Особенности наследования плазмид биодеградации в клетках гомо- и гетерологичных хозяев. // Там же. – 2008. – 77, № 1. – С. 21–28.
4. Манятис Т., Э. Фрич, Дж. Самбрук Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование: Пер. с англ. под. ред. А.А Баева, К.Г. Скрябина. – Москва: Мир, 1984. – 480 с.
5. Мартиненко О.І. Методи молекулярної біотехнології: лабораторний практикум / Під ред. проф. Д.М. Говоруна. – Київ: Академперіодика, 2009. – 232 с.
6. Пуріш Л. М., Асаулєнко Л. Г. Динаміка сукцесійних змін у сульфідогенній мікробній асоціації за умов формування біоплівки на поверхні сталі // Мікробіол. журн. – 2007. – 69, №6. – С. 19–25.
7. Сергеева Ж.Ю. Товкач Ф.И. Распространение внехромосомных кольцевых ДНК у *Erwinia carotovora* // Доповіді НАН України. – 2008. – №12. – С. 149–153.
8. Товкач Ф. И. Выделение и предварительная характеристика криптических плазмид *Erwinia carotovora* // Микробиология. – 2001. – 70, № 6. – С.804–810.
9. Angels M.L., Marshall K.C., Goodman A.E. Plasmid transfer between marine bacteria in the aqueous phase and biofilms in reactor microcosms // Appl. Environ. Microbiol. – 1993. – 59, N 3. – P. 843–850.
10. Castañeda-Carrión I.N., Whiteley M., Krumholz L.R. Characterization of pNC1, a small and mobilizable plasmid for use in genetic manipulation of *Desulfovibrio africanus* // J. Microbiol. Methods. – 2009. – 79, N 1. – P. 23–31.
11. Christensen B. B., Sternberg C., Andersen J. B., Eberl L., Moller S., Givskov M., Molin S. Establishment of new genetic traits in a microbial biofilm community // Appl. Environ. Microbiol. – 1998. – 64, N 6. – P. 2247–2255.
12. Davey M. E., O'Toole G. A. Microbial Biofilms: from ecology to molecular genetics // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 2000. – 64, N4. – P. 847–867.
13. Haagensen J.A., Hansen S.K., Johansen T. In situ detection of horizontal transfer of mobile genetic elements // FEMS Microbiol. Ecol. – 2002. – 42. – P. 261–268.
14. Hamilton W.A. Microbially influenced corrosion in the context of metal microbe interactions // Microbial corrosion / Ed. by C.A. Seguiria. – London, 2000. – P. 3–17.
15. Hausner M., Wuerzt S. High rates of conjugation in bacterial biofilms as determined by quantitative in situ analysis. // Appl. Environ. Microbiology. – 1999. – 65, N 8. – P. 3710–3713.