

ВЗАИМООТНОШЕНИЯ В СИСТЕМЕ ФАГ-КЛЕТКА У ЭНТОМОПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ *BACILLUS THURINGIENSIS*

Б.П. КАРАБЕКОВ, А.С. ОВСЕПЯН, А.Х. ЧАХАЛЯН, С.К. КЕЛЕШЯН,
А.С. ЗУРАБЯН

НИИ "Биотехнология", АОЗТ, 375056, Ереван

Изучены промышленные штаммы *Bacillus thuringiensis*, используемые в производстве энтомоцидных препаратов, и вызывающие их лизис бактериофаги. Показано, что большинство этих штаммов лизогенны, однако полученные результаты дают основание считать, что производственный фаголизис является скорее результатом заражения культуры извне. Разработан специальный способ получения фагорезистентного штамма C-5 var. *dendrolimus* - продуцента дендробациллина, который выведен в производство.

Աստիճանափրկել են միջատասպան պատրաստուկներ արտադրելու համար օգտագործվող *Bacillus thuringiensis*-ի արդյունաբերական շտամների լիզիսը առաջացնող ֆագերը: Ցույց է տրվել, որ այդ շտամների մեծ մասը լիզոգեն է, սակայն ստացված արդյունքները հիմք են ծառայում եզրակացնելու, որ արտադրական ֆագոլիզիսը ավելի շուտ տեղի է ունենում արտադրող շտամի արտաքին միջավայրից վարակվելու հետևանքով: Մշակվել է հատուկ մեթոդ, որի շնորհիվ ստացվել է արտադրության մեջ է ներդրվել ֆագերի նկատմամբ կայուն դենդրոբացիլինի արտադրիչ C-5 var. *dendrolimus* շտամը:

The industrial strains of *Bacillus thuringiensis* used for producing of entomocidic preparations and bacteriophages causing their lysis have been studied. Most of these strains have been shown to be lysogenic, but the results obtained caused the supposition, that the industrial strains lysis was rather the result of outside contamination of the producer with the virus. A specific method for isolation and industrial application of the phage resistant strain C-5 var. *dendrolimus* has been developed.

Бактерии энтомопатогенные - система фаг-клетка - *Bacillus thuringiensis* - фаголизис

Все отрасли микробиологической промышленности, использующие в технологических процессах бактерии, неоднократно сталкиваются с лизисом бактерий-продуцентов специфическими бактериофагами. Фаголизисы наблюдались в различных странах [2, 3, 10-12]. Успешная организация борьбы с фаголизисом на производстве предполагает прежде всего хорошее знание особенностей взаимоотношений между вирусом и бактериальной клеткой.

По имеющимся в литературе данным, в отношении фагов *Bacillus thuringiensis* не применимы обычные понятия "умеренный" и "вирулентный", предполагающие определенные механизмы отношений между бактериальной клеткой и вирусом [1, 8].

Пробелы в генетическом изучении *B.thuringiensis* и их фагов значительно затрудняют поиски путей преодоления фагочувствительности производственных штаммов и определение источников появления литических бактериофагов на производстве. Поэтому очевидность проведения фундаментальных исследований в этой области не вызывает сомнений.

Как известно, фаголизис бактериальной культуры может быть результатом: а) заражения культуры диким (природным) фагом извне; б)

вирулентной мутации умеренного фага, которым лизогенны клетки данной бактериальной культуры; в) индукции профага у растущей лизогенной культуры, вызванной теми или иными факторами; г) нарушения равновесия временно установившегося фагоносительства у данной культуры [9]. С целью выяснения механизмов, приводящих к фаголизису производственных культур, а также взаимоотношений между бактериальным вирусом и клеткой хозяина были предприняты настоящие исследования.

Материал и методика. В работе использовано свыше 100 штаммов *B. thuringiensis*, представляющих все известные серотипы и варианты этого микроорганизма. Основное количество штаммов получено из Всесоюзного института защиты растений (Ленинград). Используются также штаммы, выделенные в Сибири, в Средней Азии, производственные штаммы-продуценты энтобактерина и дендробациллина (из Бердского химзавода), ряд штаммов, полученных из ВНИИгенетика (Москва).

Использованы вирулентные фаги, явившиеся причиной фаголизисных производственных операций при производстве энтобактерина и дендробациллина на Бердском химзаводе, трансдуцирующие фаги Ср-51 и Ср-54 *B. cereus* 569, любезно предоставленные нам профессором Торном (США). Ряд бактериофагов получен нами при работе с коллекцией штаммов *B. thuringiensis*, находящейся в нашем распоряжении.

В качестве питательной основы для приготовления жидких и агаризованных сред применяли 4%-ный гидролизат рыбный (паста) производства Дагестанского НИИ питательных сред (аминный азот - 3600 мг %) из расчета 4%. Агаризованные среды содержали 0,7 и 1,2% агар-агара при работе двуслойным методом Грация и 2,5% - при работе с бактериями. pH питательных сред устанавливали в пределах 7,0-7,2. Для нормальной споруляции к жидким средам добавляли $4,5 \times 10^6$ M $MnSO_4 \cdot 7H_2O$. Жидкие культуры бактерий выращивали с аэрацией на качалках со скоростью вращения до 220 об/мин при температуре 28-30°.

Штаммы бактерий проверяли на фагоносительство в перекрестном spot-тесте. Индукцию профага у лизогенных штаммов проводили с помощью УФ-облучения лампой БУВ-30 на расстоянии 50 см от поверхности облучаемой культуры.

Споровые инокулы готовили путем смыва стерильным физраствором густого посева культуры с поверхности агара после 5-6-суточного инкубирования при 30° с повторным центрифугированием при 3000 об/мин в течение 20 мин при 4°. Отмытые споры прогревали при 80° в течение 20 мин, подвергали повторному центрифугированию в тех же условиях и ресуспендировали в 10 раз меньшем объеме стерильного физиологического раствора. Приготовленный таким образом инокулум содержал в среднем 10^{10} - 10^{11} спор/мл и хранился в холодильнике при 4-8°.

Мутагенизацию спор проводили путем их обработки нитрозогуанидином в концентрации 500 мкг/мл в течение 30 мин в цитратном буфере (pH 6,0).

Применявшиеся в работе другие специальные методы исследования приводятся по ходу изложения материала.

Результаты и обсуждение. Исследовали лизогенность производственных штаммов 69-6 (*var. gallerae*, H5a5b) и 49-9 (*var. dendrolimus*). Подбор доз УФ-облучения, способных индуцировать профаг у названных штаммов, производился по кривой выживаемости этих штаммов при УФ - облучении. Было установлено, что примерно 6 мин облучения достаточно, чтобы вызвать гибель 90% клеток в результате их лизиса. Лизис культуры наступал по истечении 100 мин с момента завершения облучения. Лизису предшествовал период остаточного роста.

Полученный лизат обрабатывали хлороформом и проверяли на наличие в ней свободного фага в spot-тесте на ряд штаммов.

Установлено, что лизат культуры штамма 69-6 активен для 8 из 19

исследованных штаммов, что выражалось в возникновении зон лизиса на газоне этих культур. Лизаты штамма 49-9 были не активны на исследованных культурах. Все попытки получить изолированные колонии индуцированного литического агента штамма 69-6 оказались безуспешными. Выделить фаг из литических зон чувствительных культур не удалось. Индуцированный литический агент не перевивался ни на одной из 8 чувствительных культур, что не свидетельствовало в пользу его фаговой природы. Однако лизогенность штамма 69-6 удалось показать при перекрестной проверке всех штаммов коллекции на содержание спонтанного фага. Выяснилось, что как индуцированные лизаты штамма 69-6, так и его необлученная культуральная жидкость образуют хорошо перевиваемые негативные колонии (НК) на газоне штамма *B. megaterium* IFO-3003, причем в обоих образцах содержится одинаковое количество фаговых частиц 10^3 - 10^4 . Обнаруженный фаг был обозначен символом GP-696. На газоне штамма IFO-3003 он образует мутные НК, окруженные характерным ореолом диаметром 2-3 см с центральным ростом. Бульонные культуры штамма 69-6 содержали фаг GP-696, титр которого через 24 часа роста в условиях аэрации доходил до $1-2 \times 10^6$ частиц/мл. Одна НК колония фага GP-696 содержала порядка 10^7 - 10^8 частиц/мл.

Фаг GP-696 был очищен 5-кратным пересевом отдельных НК на газоне индикаторного штамма IFO-3003 и получен в высоком титре.

Результаты сравнительного изучения свойств фага GP-696 и фага ВФ, выделенного при производстве энтобактерина с использованием штамма 69-6, представлены в табл. 1. Видно, что фаги ВФ и GP-696 четко отличаются друг от друга по всем исследованным свойствам и, следовательно, не идентичны. Отсюда следует, что случаи фаголизиса этого штамма на производстве не связаны с его лизогенным состоянием.

Таблица 1. Свойства фагов ВФ и GP-696

Исследованные свойства	ВФ	GP-696
Лизирует штамм 69-6	+	-
Лизирует штамм IFO-3003	-	+
Чувствителен к низким температурам (инактивируется в холодильнике)	+	-
Чувствителен к обработке хлороформом	-	+
Инактивируется антисывороткой GP-696	-	+
Инактивируется антисывороткой ВФ	+	-
Оптимальная pH среды	7,0	7,5

Примечание: "+" - наличие признака; "-" - отсутствие признака.

Фагом GP-696 была лизогенизирована культура штамма *B. megaterium* IFO-3003 и получен его лизогенный вариант - штамм IFO-3003 (PG-96), иммунный к суперинфекции фагом GP-696.

Кроме штамма 69-6, при перекрестной проверке spot-тестом лизогенным оказались еще 10 из 25 исследованных штаммов, в том числе 5 штаммов 5 серотипа (*var. galleriae* H5a5b) и по одному из проверенных штаммов вариантов *dendrolimus*, *aizawai*, *finitimus*, *kenyae*, *entomocidus*. Все выделенные фаги отличались от фагов ВФ и GP-696 тем, что были устойчивы к действию хлороформа и низких температур, имели различных хозяев. Лизогенизация чувствительных культур этими фагами, наряду с лизогенным по фагу GP-696 штаммом IFO-3003, позволила изучить возможность образования у этих фагов С- и Vir-мутантов, способных преодолеть иммунитет лизогенных культур к суперинфекции. Результаты этих исследований приведены в табл. 2. Все штаммы, указанные в табл. 2, оказались устойчивыми к собственным фагам, т. е. были истинными лизогенами. Наличие у этих фагов С-мутантов при росте на индикаторных штаммах позволяет предположить появление у них также Vir-мутантов, хотя спонтанное появление их в штоках исследованных фагов мы не обнаружили.

Таблица 2. Способность фагов к образованию С и Vir-мутантов

Фаг выделения	Источник чувствительная	Индикаторная спонтанных мутантов культура	Наличие в штоках	
			С	Vir
PAz-1	<i>var. aizawai</i>	<i>B. cereus</i> 569	+	-
PF-1	<i>var. finitimus</i>	" " "	+	-
PE	<i>var. entomocidus</i>	<i>B. thuringiensis var. berliner</i>	+	-
PKen	<i>var. kenyae</i>	" " "	-	-
PD	<i>var. dendrolimus</i>	<i>B. cereus</i> 569	-	-
PG142	<i>var. galleriae</i>	<i>B. megaterium</i>	+	-
PG262	" " 262	" " "	+	-
PG316	" " 316	" " "	+	-
PG672	" " 672	" " "	-	+
PG3014	" " 3014	" " "	+	-

Не удалось выделить Vir-мутанты и при мутагенизации фагов гидроксиламином, проведенной по описанной методике [10].

Сравнительный анализ спектров литической активности фагов, выделенных на производстве и в лабораторных условиях из штаммов *var. galleriae* на различных промышленных штаммах *var. dendrolimus*, показал, что штаммы *var. dendrolimus* нечувствительны к фагам *var. galleriae*, выделенным из лизогенных культур в лабораторных условиях, что, по-видимому, свидетельствует об ином происхождении производственных фагов. Интересно, что заводские фаги, выделенные на производстве дендробациллина, имели весьма широкий спектр литической активности практически на всех испытанных серотипах *B. thuringiensis* (табл. 3).

Таким образом, фаги, выделенные на производстве, в отличие от фагов, выделенных в лаборатории из лизогенных штаммов *var. galleriae*,

обладают широким литическим спектром действия практически для всей группы бактерий *B. thuringiensis*; вместе с тем попытки с помощью мутагенеза получить вирулентные мутанты у выделенных в лабораторных условиях умеренных фагов не удаются. Поэтому мы склонны считать случаи фаголизиса на производстве энтомоцидных препаратов с использованием штаммов *B. thuringiensis* не следствием лизогенного состояния используемых штаммов бактерий, а скорее всего наличием внешнего источника заражения.

Таблица 3. Спектр литической активности вирулентных фагов *var. dendrolimus*, выделенных на Бердском химзаводе при производстве дендробациллина

Штаммы	Бактериофаги			
	РД1	РД2	РД3	РД4
<i>var. berliner</i>	-	-	+	+
<i>var. aizawai</i>	+	+	+	+
<i>var. alesti</i>	+	+	+	+
<i>var. finitimus</i>	+	+	+	+
<i>var. entomocidus</i>	-	+	+	+
<i>var. kenyae</i>	+	+	+	+
<i>var. caucasicus</i>	-	-	+	+
<i>var. subtoxicus</i>	-	+	+	+
<i>var. galleriae</i> 69-6	+	+	+	+
<i>var. galleriae</i> 262-6	+	+	+	+
<i>var. galleriae</i> 3-16	+	+	+	+
<i>var. galleriae</i> 38	+	-	+	+
<i>var. galleriae</i> 142	-	+	+	-
<i>var. galleriae</i> 37-68	+	-	-	+
<i>var. galleriae</i> 71-3	+	+	+	+

Дальнейшие наши исследования были направлены на моделирование процесса фаголизиса бактериальной культуры при внешнем ее заражении вирулентным фагом. В этих опытах был использован производственный штамм *var. galleriae* 69-6, его беспоровые (аспорогенные) мутанты Sp-a и Sp-m. Как исходный штамм, так и его аспорогенные мутанты оказались высокочувствительными к заводскому вирулентному фагу ВФ при исследовании spot-тестом на газоне этих штаммов на пластинках агара в чашках Петри. Моделирование фаголизиса растущей культуры при внешнем заражении бактериофагом проводили по следующей методике: ночную аэрированную культуру штамма 69-6 и его аспорогенного мутанта освежали в свежем стерильном бульоне (МПБ) путем переноса культуры в серию из 10 пробирок. В первую пробирку фаг вносили сразу (время 0), в остальные - через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 18 ч роста в условиях аэрации на качалке 220 об/мин при 30°. Последнюю пробирку оставляли незараженной (контроль опыта). Фаг в пробирки добавляли в количестве 1,0 мл с титром $2,0 \times 10^8$ частиц/мл. Результаты опыта регистрировали по оптической плотности растущей культуры на фотоэлектрическом колориметре КФК. Результаты приведены в табл. 4, из данных которой следует, что время наступления литической реакции зараженной растущей культуры зависит от времени

внесения фага в культуру. В литературе имеются данные о том, что время заражения фагом растущей культуры имеет существенное значение для наступления фаголизиса [6]. Наши исследования также подтверждают это обстоятельство во взаимоотношениях фаг-культура. Из данных этой таблицы видно также, что клетки штамма-хозяина наиболее активно взаимодействуют с частицами вирулентного фага в начале логарифмической фазы роста (2-3 ч роста после освежения культуры), на более поздних стадиях роста этот процесс затруднен и не по причине начала спорогенеза, поскольку и споровый и бесспорный штаммы ведут себя идентично.

Таблица 4. Зависимость времени наступления фаголизиса растущей культуры от времени заражения ее бактериофагом

Время заражения бактериофагом, ч	Время, необходимое для начала лизиса культуры, ч	Наличие вторичного роста после фаголизиса
Контроль (фаг не добавляли)	лизиса нет	-
О время	1	-
Через 1 ч после начала роста	2	-
Через 2 ч	2	+
Через 3 ч	2	+
Через 4 ч	4	+
Через 5 ч	7	+
Через 6 ч	8	+
Через 7 ч	10	+
Через 18 ч	лизиса нет	-

Следует отметить, что через 5-6 ч после наступления полного лизиса культуры наблюдается вторичный рост, обусловленный, однако, не резистентными к литическому фагу мутантами, а новой популяцией чувствительных бактериальных клеток. При этом титр фага в растущей вторичной культуре не снижается и держится на уровне 10^8 частиц/мл. Подобное поведение чувствительной культуры в присутствии вирулентного фага является необычным и, по-видимому, является результатом временного изменения рецепторного аппарата бактериальной культуры при взаимодействии с фагом. Аналогичное поведение отмечено у *Pseudomonas aeruginosa* в присутствии вирулентного фага [7]. Авторы объясняют механизм этого явления временным смыыванием рецепторов для адсорбции фага с клеточных стенок бактерий фаговым лизоцимом, в результате чего создается временное равновесие между вирусом и клеткой хозяина. Такое поведение, по мнению авторов, сложилось эволюционно и выгодно как вирусу, так и бактерии. Это объяснение нам представляется оправданным и для случаев, описанных нами выше.

С целью выяснения роли множественности заражения (дозы фага) в возникновении литического эффекта культуру штамма 69-6 заражали фагом ВФ с различной множественностью (от 10^1 до 10^{-6}), при этом, как и в предыдущем опыте, фаг вносили в растущую культуру в разное время от начала засева культур.

Таблица 5. Время проявления фаголизиса растущей культуры штамма 69-6 в зависимости от множественности заражения фагом ВФ

Условия эксперимента	Время проявления лизиса культуры после ее заражения фагом ВФ с множественностью инфекции, ч					
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
Заражение через 1 ч после начала роста культуры	2,0	2,3	3,0	3,8	4,6	5,3
Заражение через 2 ч после начала роста культуры	2,5	2,9	4,3	6,7	лизис не наблюдается	

Из табл. 5 следует, что время, необходимое для проявления литической реакции бактериальной культуры, зависит не только от времени попадания фага в растущую культуру, но и от множественности инфекции. При попадании фага в культуру через 2 ч после ее засева при множественности инфекции 10^{-5} - 10^{-6} в течение всего срока наблюдений (8 ч) лизис культуры не наступал: она росла нормально с такими же показателями оптической плотности, что и контрольная незараженная культура.

Полученные данные позволяют считать, что при фаголизисе на производстве заражение рабочей культуры фагом в ферментаторе должно происходить или с высокой множественностью (что маловероятно), или в ранний период засева аппарата.

Поскольку в наших исследованиях не подтвердилась причастность лизогенности производственных штаммов к производственному лизису культуры-продуцента, мы предположили, что источниками внешнего заражения производственных процессов могут быть фаги близкородственных спорообразующих бактерий, тем более что, как было показано выше, умеренный фаг, которым лизогенна культура *var. gallieriae* 69-6 активен в отношении штамма *B. megaterium* IFO-3003.

Для проверки этого предположения нами была исследована эффективность посева бактериофагов СР-51 и СР-54 *B. cereus* [22, 24], тем более что литическая активность фагов в отношении некоторых штаммов *B. thuringiensis* ранее была показана [14].

Были получены различные штоки этих фагов с использованием в качестве хозяина штамма *B. cereus* 569 (эти штоки в дальнейшем будут обозначены символами СР-51.569 и СР-54.569) и чувствительного к этим штаммам *B. thuringiensis var. gallieriae* 69-6 (эти штоки отмечены символами СР-51.ВТ и СР-54.ВТ). Как показали опыты по определению относительной эффективности посева этих фагов на различных штаммах *B. thuringiensis*, она всегда выше у штоков СР-51.569 и СР-54.569 (табл. 6). Как видно из таблицы, многие штаммы *B. thuringiensis* ограничивают рост фагов СР-51 и СР-54, однако, проходя один пассаж через штамм-

хозяина *B. thuringiensis* 69-6, они модифицируются, и модифицированный фаг растет на штаммах *B. thuringiensis* с такой же высокой эффективностью, что и на штаммах *B. cereus*.

Приведенные данные позволяют думать, что некоторые гетерогенные фаги близкородственных *B. thuringiensis* спорообразующих бактерий при росте на новом хозяине способны подвергаться модификации и с высокой литической активностью развиваться на штаммах *B. thuringiensis*. Установить истинное происхождение таких фагов практически невозможно, так как их бесчисленное множество.

Таким образом, хотя полученные данные не позволяют утверждать, что производственный фаголизис является результатом применения лизогенных штаммов, есть основание думать, что фаголизис на производстве является следствием заражения культуры продуцента вирусом извне. На такую мысль наводит способность бактериофагов близкородственных спорообразующих бактерий модифицироваться, пройдя один цикл развития на клетках нового хозяина.

Таблица 6. Относительная эффективность посева фагов СР-51 и СР-54

Штамм-хозяин	Относительная эффективность посева			
	СР-51.569	СР-54.569	СР-51.ВТ	СР-54.ВТ
<i>B. cereus</i> 569	1,0	1,0	1,0	1,0
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>kenyae</i> P-35	0,2	0,1	1,0	1,0
var. <i>alesti</i> C-22	0,6	0,7	0,9	0,8
var. <i>sotto</i> C-55	0,6	0,6	0,8	0,8
var. <i>morrisoni</i>	0,3	0,7	1,0	1,0
var. <i>thompsoni</i>	0,5	0,5	1,0	1,0
var. <i>galleriae</i> 38-19	0,1	0,2	1,0	1,0
var. <i>dendrolimus</i> B-68	0,1	0,1	1,0	1,0
var. <i>insectus</i> 1-51	0,5	0,5	1,0	1,0
var. <i>caucasicus</i> 811-45	0,2	0,1	1,0	1,0
var. <i>berliner</i>	0,9	0,9	1,0	1,0
var. <i>israelensis</i>	0,5	0,5	1,0	1,0
var. <i>kurstaki</i>	0,3	0,3	1,0	1,0

Задача получения фагорезистентных мутантов-продуцентов энтобактерина и дендробациллина при таком необычном взаимодействии клеток бактерий с бактериальным вирусом у *B. thuringiensis* оказалась весьма сложной. Ни один из классических методов получения фагорезистентных мутантов, описанных Адамсом [1] и Стентом [5], не давал положительных результатов. Все выжившие в фаголизатах клетки вторичных культур оказывались носителями фага и вместе с освобождением от носительства теряли устойчивость к ним.

Для получения фагоустойчивых штаммов у производственных штаммов var. *dendrolimus* N58 и var. *galleriae* 69-6 были отобраны спонтанные мутанты, устойчивые к высоким концентрациям стрептомицина (5000 мг/мл). Последние обрабатывали нитрозогуанидином в сублетальных концентрациях: 500 мкг/мл для var. *galleriae* и 100 мкг/мл для var. *dendrolimus* в

течение 30 мин при температуре 30° в цитратном буфере (рН 6,0). Выжившие клетки высевали на пластинки 2,5%-ного мясопептонного агара, содержащего от 100 до 5000 мкг/мл стрептомицина. Поверхность пластинок предварительно пропитывали фаголизатом, содержащим не менее $1,0 \times 10^6$ фаговых частиц в 1 мл. Фаголизаты готовили на исходных чувствительных к стрептомицину штаммах 58 и 69-6. Выросшие стрептомицинустойчивые колонии с помощью spot-теста тотально проверяли на устойчивость к различным производственным вирулентным фагам.

С помощью описанной методики было проверено свыше 10 тысяч колоний и выделено 150 устойчивых к различным фагам мутантов. Последующий отбор позволил выделить лишь один мутант - С-5, который удовлетворяет требованиям производства по своим морфокультуральным и физиологическим свойствам, урожаю спор и времени высыпания спор, кристаллообразованию и вирулентности для гусениц непарного шелкопряда. Проверка полученного мутанта в производственных условиях подтвердила его положительные технологические качества [4].

ЛИТЕРАТУРА

1. Адамс М. Бактериофаги. М., 1961.
2. Арутюнян С. Генетика, 20, 5, 730-737, 1984.
3. Арутюнян С. Биотехнология, 1, 9-13, 1987.
4. Карабеков Б.П. Авт. свид. СССР 699016, 1979.
5. Стент Г. Бактериальные вирусы. М., 1963.
6. Goldberg R., Gallacota B. Spores 2, 276-290, 1961.
7. Herbert B., Gould H., Chain E. Eur. J. Biochem., 30, 330-338, 1972.
8. Kwetlas M., Rogoff M. Spores 2, 254-276, 1961.
9. Matsui T. Hakko to kole. 39, 294-308, 1977.
10. Ogata S. Biotechnol. and Bioeng., 22, 1, 177-193, 1986.
11. Oki T., Osaki A. Agric. Boil. Chem., 31, 1466-1473, 1997.
12. Oki T., Matsui T., Osaki A. Agric. Boil. Chem., 31, 861-867, 1987.
13. Thorne C. Canad. J. Microbiol., 21, 2, 328, 1975.
14. Van Tassei R., Yousten A. Canad. J. Microbiol., 22, 4, 583, 1976
15. Yelton D., Thorne C. J. Bacteriol., 102, 2, 573, 1970.

Поступила 16.IX.1997