

Т.М. Гурина, И.П. Высеканцев, О.М. Бабинец

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины,
ул. Переяславская, 23, Харьков, Украина, cguo@online.kharkov.ua*

СТАНДАРТИЗАЦИЯ ПРОЦЕССА КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES BOULARDII* ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В КОЛЛЕКЦИЯХ И БАНКАХ ПРОМЫШЛЕННЫХ ШТАММОВ МИКРООРГАНИЗМОВ

Экспериментально обоснован новый принцип реализации протокола замораживания-оттаивания при криоконсервировании микроорганизмов – инициация процесса кристаллообразования на этапе охлаждения и оттаивание с контролируемой скоростью нагрева. Это позволяет повысить жизнеспособность клеток, гарантировать одинаковое их количество в каждом препарате и уменьшить риск контаминации образцов на этапе оттаивания.

Ключевые слова: дрожжи, криоконсервирование, переохлаждение, инициация кристаллообразования, коллекции микроорганизмов.

Микроорганизмы играют важную роль в современных производствах. Непосредственно в биотехнологических производствах все чаще используют консервированный посевной материал, что позволяет его стандартизировать и хранить в необходимом для производства количестве, а также снизить риск контаминации продуцентов в рабочих ферментерах.

Известно большое количество способов консервирования микроорганизмов – хранение под минеральным маслом с периодическими пересевами, высушивание в воздухе на различных носителях, L-высушивание, тепловое высушивание, лиофилизация, хранение при умеренно низких температурах, криоконсервирование [6, 10, 12]. Для решения частных задач в практике банков и при создании коллекций микроорганизмов используют любой из перечисленных способов консервирования, но для долгосрочного хранения микроорганизмов, как правило, применяют лиофилизацию и криоконсервирование [8].

Однако процесс лиофилизации способен индуцировать мутации и селекцию штаммов с определенными свойствами, а сроки долгосрочного хранения ряда лиофилизированных микроорганизмов при положительных и умеренно низких температурах ограничены [4, 6, 12, 13]. Индукция мутагенных процессов в микробных клетках после криоконсервирования не зарегистрирована, а сроки хранения микроорганизмов при температуре жидкого азота и в близких к ней диапазонах по данным разных коллекций насчитывают десятки лет [6, 8]. Учитывая это, для долгосрочного хранения типовых видов, референтных культур, производственных штаммов, генетического материала используют криоконсервирование.

Цель работы – разработать методы стандартизации этапов криоконсервирования, связанных с замораживанием-оттаиванием биообъекта, а также максимально исключить возможность контаминации препаратов при оттаивании.

Материалы и методы. Объектом исследования был пробиотический штамм дрожжей *Saccharomyces boulardii*, выделенный из коммерческого препарата «Энтерол»® (Biocodex, France). Дрожжи выращивали на сусло-агаре с содержанием сахара 8° по Балингу [2] при температуре 30°C в течение 48 часов. Для получения суспензий клетки смывали с поверхности агаризированной среды соответствующей суспензионной средой. В качестве среды суспендирования использовали пивное сусло 8°Б, физиологический раствор, 5%-й раствор сахарозы и 5%-й водный раствор диметилсульфоксида (ДМСО). Концентрация клеток в полученных суспензиях составляла 10⁸ КОЕ/мл. Суспензию дрожжей разливали по 1,5 мл в полипропиленовые криобирки фирмы «Nunc» (Германия) рабочим объемом 1,8 мл.

Замораживание *Saccharomyces boulardii* осуществляли в программном замораживателе «Сгуосон» (Германия) согласно двум протоколам. Протокол I: охлаждение с постоянной скоростью 1 град/мин до температуры -40°C с последующим погружением в жидкий азот. Протокол II аналогичен протоколу I, но дополнительно использовали процедуру температурной инициации кристаллообразования (ТИК). Скорость охлаждения 1 град/мин является наиболее эффективной при замораживании *S. boulardii* [3].

© Т.М. Гурина, И.П. Высеканцев, О.М. Бабинец, 2013

Регистрацию термограмм замораживания проводили при помощи медь-константановой термопары и самописца «Endim» 622.01 (Германия). По термограммам замораживания определяли температуры кристаллизации сред суспендирования и предельные значения степени переохлаждения образца данного объема при заданной скорости охлаждения.

Биообъекты хранили при температуре жидкого азота (-196°C) в течение 3 месяцев. Образцы, замороженные без процедуры ТИК, оттаивали на водяной бане температурой 30°C (протокол I). Образцы, замороженные с использованием процедуры ТИК, оттаивали в программном замораживателе, предварительно охлажденном до -130°C, с постоянной скоростью нагрева 20 град/мин до температуры 20°C (протокол II).

При оценке эффективности криоконсервирования отдельных клеток микроорганизмов использовали термин «жизнеспособность» – сохранение микробной клеткой способности к делению и образованию макроколоний после посева на агаризованную среду [5]. Жизнеспособность дрожжей определяли «чашечным» методом Коха [5]. В качестве контроля брали не подвергавшиеся замораживанию суспензии клеток в соответствующих средах консервирования.

Серийные разведения суспензий из контроля и каждого образца после замораживания проводили в 10 параллельных рядах пробирок, внося при каждом разведении по 0,1 мл суспензии в 9,9 мл физиологического раствора. Высевали по 0,1 мл из каждой из 10-ти параллельных пробирок на 2 чашки с сусло-агаром, таким образом, количество n из каждого образца равнялось 20.

Статистическую обработку полученных экспериментальных данных проводили с использованием пакета программ MS Excel. Для оценки достоверности различий между экспериментальными группами применяли однофакторный дисперсионный анализ и t -критерий Стьюдента [1], считая достоверными различия с показателем значимости $p < 0,05$. Данные представляли как $M \pm m$, где M – среднее значение, m – стандартное отклонение.

Результаты и их обсуждение. На этапе замораживания одним из основных факторов, влияющих на показатели сохранности криоконсервируемых биообъектов, является степень переохлаждения образца перед началом процесса кристаллообразования [11]. Переохлаждением замораживаемого раствора называется разность между температурой в той точке образца, где возникает кристалл льда, и температурой плавления этого раствора. Результатом высокой степени переохлаждения является уменьшение скорости дегидратации клеток и, следовательно, увеличение вероятности внутриклеточной кристаллизации. Дополнительным фактором повреждения клеток может выступать кратковременное повышение температуры и внеклеточной осмолярности в момент начала кристаллизации. В том случае, когда оба фактора действуют одновременно, отрицательные последствия для сохранности клеток более резко выражены по сравнению с воздействием на клетку только одного переохлаждения. Кроме того, как было показано в [9], механическое взаимодействие между кристаллами льда и клетками также может приводить к повреждению клеток. Следовательно, переохлаждение является важным параметром в процессе замораживания, поскольку оно влияет на рост зародышей кристаллов льда, конечную структуру и величину кристаллов льда. Однако температуру начала кристаллизации трудно предсказать на практике, так как степень переохлаждения раствора, возникающая до начала кристаллизации в нем, является случайным процессом.

Хотя образование кристалла льда в замораживаемой клеточной суспензии является вероятностным процессом, значение температуры, при которой в данной точке образца начинается кристаллообразование, для одного и того же биообъекта, как правило, хорошо воспроизводится от эксперимента к эксперименту в пределах некоторого интервала. Предельные значения этого интервала температур для данного типа криоконтейнера, объема образца в нем и выбранной скорости охлаждения легко определяются экспериментальным путем. Причем степень переохлаждения увеличивается с уменьшением скорости охлаждения и увеличением процентного содержания воды в криозащитной среде.

Для снижения возможной величины степени переохлаждения образцов в процессе замораживания нами предложен способ ТИК в охлаждаемом биообъекте. Способ предназначен для реализации в программных замораживателях, процедура ТИК входит как составляющая режима охлаждения. В качестве управляющих параметров для начала процедуры ТИК служат

температура кристаллизации криоконсервирующего раствора и характерная для него средняя величина переохлаждения при выбранной скорости охлаждения. Оба параметра определяют экспериментально по термограммам замораживания среды суспендирования.

Суть способа заключается в том, что в заданный момент времени в камеру программного замораживателя подается ударная доза охлаждающего газового потока, за счет чего кратковременно резко увеличивается скорость охлаждения образца, особенно в той его части, которая находится вблизи наружной стенки криоконтейнера и в которой, как правило, начинается процесс образования зародышей льда. Началом проведения процедуры ТИК служит температура, превышающая температуру кристаллизации криоконсервирующей среды на среднюю величину степени переохлаждения, определенную для данной конкретной среды и скорости охлаждения. Для определения этой температуры используют набор термограмм, аналогичный представленным кривым на рис. 1 (А, Б). Чем большее количество экспериментальных термограмм используется для определения средней величины переохлаждения для данной скорости охлаждения и выбранной среды суспендирования, тем точнее можно вычислить температуру начала процедуры ТИК.

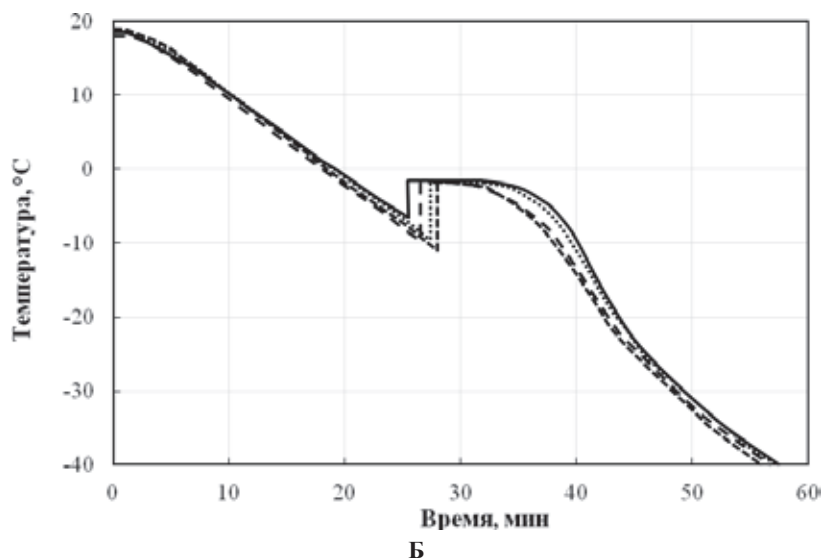
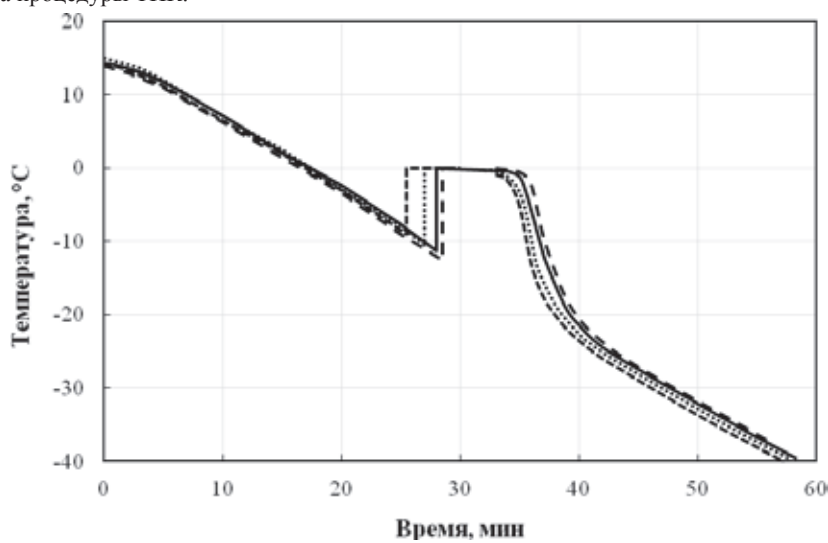


Рис. 1. Термограммы замораживания пивного сусла (А) и 5 %-го водного раствора ДМСО (Б), полученные при охлаждении с постоянной скоростью 1 град/мин.

Для выяснения возможной степени переохлаждения образцов в процессе замораживания со скоростью 1 град/мин были проведены эксперименты по замораживанию используемых для *S.boulardii* консервирующих сред. Установлено, что при одновременном замораживании 10 криопробирок, содержащих одну и ту же среду суспендирования, величина степени переохлаждения в разных образцах могла отличаться более чем в 2 раза.

Для примера на рис. 1 показаны термограммы замораживания для 4-х образцов пивного сусле (А) и 5 %-го водного раствора ДМСО (Б). Как видно (рис. 1 А, Б) предельные значения возможной величины переохлаждения значительно отличаются друг от друга. Аналогичные экспериментальные термограммы замораживания при той же постоянной скорости охлаждения были получены для всех исследуемых сред консервирования *S.boulardii*. Наибольший разброс степени переохлаждения наблюдали в пивном сусле (от 8 до 13°C), наименьший (от 4,5 до 9,2°C) – в 5 %-м водном растворе ДМСО. Предельные величины степени переохлаждения для физиологического раствора и 5 %-го раствора сахарозы имели промежуточные значения. Средние значения степени переохлаждения, определенные для рассматриваемых сред суспендирования по экспериментальным термограммам замораживания, были: пивное сусле – 11,2°C, физиологический раствор – 10,8°C, 5 %-й раствор сахарозы – 9,5°C, 5-й водный раствор ДМСО – 6,5°C.

Предложенный способ температурной инициации кристаллообразования имеет ряд преимуществ по сравнению с ручным сидингом, который наиболее часто применяется на практике. При использовании ТИК полностью исключается переохлаждение как случайный процесс и кристаллизация в образцах начинается в момент проведения процедуры ТИК. Для рассматриваемых сред суспендирования при использовании процедуры ТИК во всех одновременно замораживаемых образцах степень переохлаждения не превышает 1,5 °C. Процедура ТИК позволяет инициировать процесс зародышеобразования во всех образцах одновременно, причем с минимальной степенью переохлаждения, одинаковой во всех криоампулах, не требует вмешательства оператора, осуществляется путем использования возможностей современных программных замораживателей.

Для подтверждения влияния степени переохлаждения и способа оттаивания на сохранность клеточной суспензии, был проведен сравнительный эксперимент по замораживанию клеток *S.boulardii* в четырех исследуемых средах суспендирования. Замораживание дрожжей *S. boulardii* в разных средах криоконсервирования (по 5 образцов для каждой среды) проводили согласно описанным протоколам I и II. Результаты сохранности клеток в каждом образце представлены в таблицах 1, 2.

Таблица 1

Сохранность клеток *S. boulardii* в отдельных образцах после замораживания-оттаивания по протоколу I

Среда консервирования	Контроль (n=20) M± m	Количество КОЕ/млх10 ⁸ в каждом образце после замораживания-оттаивания, (n=20)					Среднее M± m
		1	2	3	4	5	
Пивное сусле	2,4±0,1	*# 1,6±0,1	# 2,4±0,1	 2,3±0,1	*# 1,9±0,1	# 2,6±0,1	* 2,16±0,2
Физ. раствор	2,5±0,1	*# 2,9±0,1	*# 2,1±0,1	*# 1,8±0,2	*# 2,7±0,1	*# 1,9±0,2	* 2,28±0,1
5% сахарозы	2,0±0,1	*# 2,4±0,1	# 1,9±0,1	*# 1,5±0,1	# 1,8±0,1	*# 2,2±0,1	1,96±0,1
5% ДМСО	2,2±0,1	*# 1,7±0,1	*# 1,5±0,2	*# 2,4±0,1	*# 2,7±0,1	*# 1,5±0,1	* 1,96±0,1

Примечания:

- 1) контроль – количество КОЕ/млх10⁸ до замораживания, (n=20);
- 2) среднее – количество КОЕ/млх10⁸ в образцах после замораживания, (n=20);
- 3) M – среднее значение; m – стандартное отклонение; * – p<0,05 между значениями M в контроле и после замораживания; # – p<0,05 при сравнении значений M соседних групп.

Таблица 2

Сохранность клеток *S. boulardii* в отдельных образцах после замораживания-оттаивания по протоколу II

Среда консервирования	Контроль (n=20)	Количество КОЕ/млх10 ⁸ в каждом образце после замораживания-оттаивания, (n=20)					Среднее
		1	2	3	4	5	
		M± m	M± m	M± m	M± m	M± m	
Пивное сусло	2,4±0,1	2,4±0,1	2,4±0,1	2,3±0,1	2,4±0,1	2,5±0,1	2,4±0,1
Физ. раствор	2,5±0,1	2,5±0,3	2,2±0,2	2,4±0,3	2,5±0,2	2,6±0,1	2,44±0,2
5% сахарозы	2,0±0,1	2,0±0,1	2,0±0,2	2,1±0,2	1,9±0,3	2,0±0,2	2,0±0,2
5% ДМСО	2,2±0,1	2,0±0,2	2,0±0,2	2,2±0,3	2,0±0,2	2,3±0,2	2,1±0,2

Примечания:

- 1) контроль – количество КОЕ/млх10⁸ до замораживания, (n=20);
- 2) среднее – количество КОЕ/млх10⁸ в образцах после замораживания, (n=20);
- 3) М – среднее значение; m – стандартное отклонение. Различия между значениями М в контроле и после замораживания и значениями М в образцах после замораживания недостоверны.

После замораживания согласно протоколу I среднее количество жизнеспособных клеток из образцов, суспендированных в пивном сусле, физиологическом растворе и 5 %-м растворе ДМСО было достоверно ниже, чем в контроле (табл. 1). При сравнении средних значений количества жизнеспособных клеток в каждом из образцов с соответствующей средой консервирования установлено, что в пивном сусле в двух образцах (1 и 4) жизнеспособных клеток достоверно ниже, чем в контроле, а в трех – не отличаются от контроля. Установлены также достоверные различия между средними показателями жизнеспособности из отдельно взятых образцов. После замораживания в физиологическом растворе и в 5 %-м растворе ДМСО среднее количество жизнеспособных клеток из всех образцов и в каждом отдельном образце были достоверно ниже контрольных значений. Также имелись достоверные различия в показателях жизнеспособности между всеми образцами. После замораживания в 5 %-м растворе сахарозы среднее количество жизнеспособных клеток из всех образцов не отличалось от контроля и имелись достоверные различия в показателях жизнеспособности между отдельными образцами.

После замораживания согласно протоколу II (табл. 2) среднее количество жизнеспособных клеток из всех образцов с каждой средой консервирования не отличались от контрольных значений. Отсутствовали также достоверные различия между отдельными образцами.

До настоящего времени было установлено, что на исходную криорезистентность клеточных форм микроорганизмов могут влиять особенности строения и физиологии клеток, которые обусловлены принадлежностью к определенному таксону, возрастом микробной культуры, стадией клеточного цикла, составом ростовой среды, условиями культивирования (аэрация, температура, рН среды, концентрация метаболитов и др.). На сохранность микробных клеток в процессе криоконсервирования влияют исходная концентрация клеток, состав среды консервирования, режимы замораживания-оттаивания [6, 8].

Унифицированных методов криоконсервирования для разных семейств и родов микроорганизмов не существует. Учитывая количество факторов, влияющих на исходную резистентность, в большинстве случаев необходимо разрабатывать индивидуальные протоколы криоконсервирования. Для некоторых видов микроорганизмов и коммерческих препаратов такие протоколы отсутствуют или проведены лишь фрагментарные исследования. В тоже время существует ряд общих закономерностей в реализации режимных параметров, которые свойственны любому протоколу криоконсервирования.

Современные технологии производства требуют исключения вмешательства человеческого фактора в процесс производства и гарантии воспроизводства результатов криоконсервирования от эксперимента к эксперименту, а также максимального исключения возможности микробной контаминации и вероятности попадания хранящихся коллекционных штаммов и продуцентов в окружающую среду.

Известно, что для уменьшения повреждения клеток в процессе криоконсервирования с низкими скоростями охлаждения при нагреве рекомендуется использовать высокие скорости нагрева [7]. При оттаивании в водяной бане высокие скорости нагрева обеспечиваются только на начальной стадии. По мере уменьшения температурного градиента между температурой водяной бани и температурой оттаиваемого биообъекта снижается и скорость нагрева образца, поэтому при температурах, близких к температуре плавления основной массы льда, в образце возможно развитие процесса рекристаллизации. Рекристаллизация перед плавлением основной массы льда в образце является одним из механических факторов криповреждения клеток на этапе оттаивания. Это является существенным недостатком оттаивания биообъектов на водяной бане при фиксированной температуре последней, особенно в присутствии вторичной упаковки, когда вместо того, чтобы увеличить скорость нагрева биообъекта перед плавлением основной массы льда в образце, она наоборот, постоянно снижается.

Результаты представленных экспериментов свидетельствуют о том, что в процессе криоконсервирования переохлаждение образцов и их оттаивание в водяной бане способствуют значительному разбросу показателя сохранности одновременно замораживаемых биообъектов (протокол I).

Преимущество использованного нами протокола криоконсервирования с контролируемой скоростью нагрева (протокол II) состоит в том, что обеспечивается лучшая повторяемость результатов за счет исключения случайных ошибок, которые неизбежны при ручном размораживании образцов на водяной бане. Особенно критичен для сохранности биообъектов перегрев препаратов во время размораживания на водяной бане из-за несоблюдения ряда важных режимных параметров размораживания (периодическое встряхивание криопробирок с биообъектом, постоянное перемешивание воды в бане, окончание процедуры размораживания при появлении жидкой фазы в образце или полного исчезновения кристаллов льда).

Экспериментально обоснованный нами протокол криоконсервирования (II) имеет еще одно преимущество – существенное снижение риска контаминации криоконсервированных образцов на этапе оттаивания и исключение возможности попадания микроорганизмов из этих образцов в окружающую среду за счет значительного снижения градиента температур между извлеченным из жидкого азота образцом и начальной температурой среды нагрева. Таким образом, в случае попадания в процессе хранения жидкого азота вовнутрь криопробирки снижается интенсивность его испарения и возможность выноса микробных клеток в окружающую среду. Для снижения вероятности контакта содержимого контейнеров с окружающей средой используют дополнительную вторичную упаковку. Однако при размораживании препаратов во вторичной упаковке нарушается режим нагрева, что приводит к дополнительному разбросу показателей жизнеспособности микроорганизмов в отдельных образцах.

Довольно часто при использовании в технологических процессах криоконсервированных стартовых культур требуется снижение в средах консервирования концентрации классических криопротективных веществ или их полное исключение. Однако при снижении концентрации криопротектора увеличивается степень переохлаждения образцов перед началом кристаллообразования при одинаковых скоростях охлаждения. В этом случае возрастает значение предложенной процедуры ТИК как фактора, позволяющего снизить повреждение клеток на этапе замораживания.

Таким образом, описанный нами протокол криоконсервирования позволяет достоверно снизить гибель клеток в процессе замораживания-оттаивания, стандартизировать количество клеток в отдельно хранящихся образцах и исключить риск перекрестной контаминации консервированных культур на этапе оттаивания в жидкой среде. Особенности предложенного протокола криоконсервирования могут быть использованы и при криоконсервировании других микроорганизмов.

Т.М. Гурина, І.П. Висеканцев, О.М. Бабінець

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, вул. Переяславська, 23, Харків, Україна,

**СТАНДАРТИЗАЦІЯ ПРОЦЕСУ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ ДРІЖЖІВ
SACCHAROMYCES BOULARDII ДЛЯ ВИКОРИСТАННЯ В КОЛЕКЦІЯХ
І БАНКАХ ПРОМИСЛОВИХ ШТАМІВ МІКРООРГАНІЗМІВ**

Резюме

Експериментально обґрунтовано новий принцип реалізації протоколів заморожування-відтавання при кріоконсервуванні мікроорганізмів – ініціація процесу кристалоутворення при охолодженні та відтавання з контрольованою швидкістю нагріву. Це дозволяє підвищити життєздатність клітин, гарантувати однакову їх кількість у кожному препараті та зменшити ризик контамінації зразків на етапі відтавання.

Ключові слова: дріжджі, кріоконсервування, переохолодження, ініціація кристалоутворення, колекція мікроорганізмів.

T.M. Gurina, I.P. Vysekantsev, O.M. Babinets

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine, National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov

**STANDARDIZATION OF CRYOPRESERVATION PROCESS OF
SACCHAROMYCES BOULARDII YEASTS FOR USAGE IN COLLECTIONS
AND BANKS OF INDUSTRIAL MICROORGANISM STRAINS**

S u m m a r y

New implementation principle of freeze-thawing during cryopreservation of microorganisms, initiation of the process of crystal formation at cooling and thawing stage with the controlled rate of heating was experimentally substantiated. This allows increasing the cell viability, guaranteeing their equal number in each preparation, decreasing the contamination risk of the samples at thawing stage.

The paper is presented in Russian.

Key words: yeast, cryopreservation, supercooling, initiation of crystal formation, collection of microorganisms.

The authors' address: Gurina T.M., Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine, National Academy of Sciences of Ukraine; 23, Pereyaslavskaya St., Kharkov, 61015, Ukraine.

1. Атраментова Л.А., Утевская О.М. Статистические методы в биологии. – Горловка: Видавництво «Ліхтар», 2008. – 248 с.
2. Афанасьева О.В. Микробиологический контроль хлебопекарного производства. – М.: Пищевая промышленность, 1976. – 144 с.
3. Висеканцев И.П., Бабинец О.М., Марценюк В.Ф., Гурина Т.М. Сравнительное изучение влияния режимов кріоконсервирования на свободные и иммобилизованные клетки пробиотика *Saccharomyces boulardii* // Проблемы кріобіології. – 2012. – 22, № 1. – С. 21–29.
4. Демина Н.С., Лысенко С.В. Влияние высушивания на содержание нуклеиновых кислот и мутационные изменения у микроорганизмов // Биологические науки. – 1989. – № 8. – С. 87–95.
5. Луста К.А., Фихте Б.А. Методы определения жизнеспособности микроорганизмов. – Пушино: ОНТИ НЦБИ АН СССР, 1990. – 186 с.
6. Сидякина Т.М. Методы консервации микроорганизмов. – Пушино, 1988. – 59 с.
7. Фуллер Б., Грин К., Грищенко В.И. Кріоконсервирование для создания банка клеток: современные концепции на рубеже XXI столетия // Проблемы кріобіології. – 2003. – № 2. – С. 62–83.
8. Fuller B.J., Lane N.J., Benson E.E. Life in Frozen State. – New York: CRS Press, 2004. – 672 p.
9. Ishiguro H., Rubinsky B. Mechanical interaction between ice crystals and red-blood-cells during directional solidification // Cryobiology. – 1994. – 31, N 5. – P. 483–500.
10. Morgan C.A., Herman N., White P.A., Vesey G. Preservation of microorganisms by drying: Areviera // J. Microbiol. Meth. – 2006. – 66, N 2. – P. 183–193.
11. Nakamura T., Takagi H., Shima J. Effects of ice-seeding temperature and intracellular trehalose contents on survival of frozen *Saccharomyces cerevisiae* cells // Cryobiology. – 2009. – 58, N 2. – P. 170–174.
12. Staplers J.A., Vlug I.J. Improvement of the straw technique for the preservation of fungi in liquid nitrogen // Mycologia. – 1987. – 79, N 1. – P. 82–89.
13. Tanaka Y., Yoh M., Takeda Y., Miwatani T. Induction of mutation in *Escherichia coli* by freeze-drying // Appl. Environ. Microbiol. – 1979. – 37, N 3. – P. 369–372.

Отримано 27.11.2012