УДК 579.864.1:577

О.П. Лівінська, І.Л. Гармашева, Н.К. Коваленко

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ МСП, Д03680, Україна

ВПЛИВ НЕОРГАНІЧНОГО ФОСФАТУ НА ВЛАСТИВОСТІ ПРОБІОТИЧНИХ ШТАМІВ ЛАКТОБАЦИЛ

Досліджено вплив неорганічного фосфату середовища культивування на гідрофобність мікробної поверхні, чутливість бактерій до дії антибіотиків та їх автолітичну активність. Нестача неорганічного фосфату призводила до зниження спорідненості бактеріальних клітин до хлороформу, етилацетату, гексану. Повне виключення неорганічного фосфату підвищувало афінність штаму Lactobacillus plantarum 11/16 до гексану. Автолітична активність штаму L. plantarum 195D не залежала від концентрації неорганічного фосфату, тоді коли її зменшення послаблювало на 15-20 % автоліз штаму L. plantarum 11/16. Виявлено зниження антибіотикочутливості лактобацил щодо дії фузидину, фуразолідону та рифампіцину. У той же час, нестача неорганічного фосфату у середовищі культивування підвищувала антибіотикочутливість до дії цефтріаксону.

К л ю ч о в і с л о в а : неорганічні фосфати, пробіотичні властивості, тейхоєві кислоти, гідрофобність, антибіотикочутливість, автолітична активність.

Одним із ключових аспектів вивчення пробіотичних властивостей молочнокислих бактерій (МКБ) є з'ясування механізмів їх здійснення. Відомо, що компоненти клітинних стінок МКБ є безпосередньо залученими у регуляцію клітинних процесів та взаємодію із зовнішнім середовищем. Зокрема, такі фосфоровмісні біополімери, як тейхоєві кислоти, можуть брати участь в адгезії мікроорганізмів до епітеліальних клітин макроорганізму, взаємодіяти із рецепторами на поверхні його клітин, обумовлюючи вплив на імунну систему. Окрім того, за різними даними, вони можуть бути залучені у такі важливі для пробіотичних властивостей аспекти як гідрофобність клітинної поверхні, чутливість до дії антибіотиків та автолітичну активність [2].

Гідрофобність мікробної поверхні визначає адгезивність бактерій до епітеліальних клітин та є фактором виживання пробіотичних штамів в умовах біотопів макроорганізму. Ще одним фактором збереження життєздатності бактерій є ступінь їх чутливості до дії антибіотиків, що залежить від поверхневих характеристик клітин та здатності взаємодіяти із антимікробною речовиною. Така взаємодія часто базується на величині заряду клітинної поверхні [4, 8]. До важливих властивостей пробіотичних штамів належить і автолітична активність, що також регулюється зарядженими поверхневими клітинними структурами, які можуть зв'язувати автолітичні ферменти [3]. Участь тейхоєвих кислот у цих процесах обумовлена наявністю у їх складі фосфатних залишків, що надають цим полімерам поліаніонних властивостей. Відомо, що кількість фосфатних груп у ланцюзі цих молекул, а також їх синтез безпосередньо залежить від кількості доступного неорганічного фосфату у середовищі культивування [2, 5]. Це може відображатися на прояві пробіотичних властивостей бактерій та їх життєздатності. Тому є важливим дослідження впливу концентрації неорганічних фосфатів у середовищі культивування на гідрофобність клітинної поверхні бактерій, їх антибіотикочутливість та автолітичні властивості. Встановлення механізмів пробіотичної дії та можливої ролі окремих мікробних компонентів лактобацил і складових середовища культивування необхідно для виявлення ефективності пробіотика.

Матеріали і методи. У роботі використовували пробіотичні штами лактобацил з Української колекції мікроорганізмів ІМВ НАНУ: *Lactobacillus plantarum* 195D*, L. plantarum* 11/16 УКМ В-2694*,* що привертають до себе науковий інтерес, обумовлений як джерелом виділення, так і високою біологічною активністю. Бактерії культивували в рідкому середовищі MRS із різним вмістом джерела неорганічного фосфату K_2HPO_4 (2 г/л – контроль, 0,6 г/л та 0 г/л). [5, 6, 7, 12]. Інкубацію проводили при 37°С протягом однієї доби.

Для дослідження **гідрофобності** мікробних клітин штамів лактобацил використовували різні за хімічними властивостями розчинники – хлороформ, етилацетат та гексан. Бактеріальні клітини центрифугували при 3000 тис. об/хв протягом 10 хв, промивали у 150 мМ розчині хлориду натрію та готували суспензію, що відповідала показнику оптичної густини 0,8 при

© О.П. Лівінська, І.Л. Гармашева, Н.К. Коваленко, 2014

довжині хвилі 600 нм. Змішували 0,4 мл суспензії та 2,4 мл розчинника і інтенсивно перемішували протягом однієї хвилини. Суміш відстоювали протягом 15 хв та вимірювали оптичну густину водної фракції. Відсоток гідрофобності обчислювали за формулою $A=100*(1-A/A_0)$, де A_0 – початкова оптична густина бактеріальної суспензії, А – оптична густина бактеріальної суспензії після змішування із розчинником [4, 8].

Дослідження **антибіотикочутливості** штамів МКБ проводили диско-дифузійним методом [1]. У роботі використовували 16 антибіотиків: меропенем, ванкоміцин, цефазолін, цефтріаксон, гентаміцин, стрептоміцин, лінкоміцин, кліндаміцин, рокситроміцин, тетрациклін, доксициклін, фузидин, фуразолідон, рифампіцин, ципрофлоксацин, норфлоксацин, що належать до різних класів за механізмом дії на бактеріальну клітину.

Бактеріальну культуру наносили в кількості 0,1 мл на агаризоване середовище, розтирали шпателем, здійснювали аплікацію дисків із антибіотиками та інкубували протягом 24–48 год при температурі 37˚С.

Діаметр зон затримки росту визначали із точністю до 1 мм у відбитому світлі, розмістивши чашки на темній матовій поверхні. Інтерпретацію результатів проводили згідно з рекомендаціями виробника.

Вплив неорганічного фосфату на **автолітичну активність** штамів лактобацил визначали за методикою [10]. Бактеріальні клітини отримували шляхом центрифугування при 3000 тис. об/хв протягом 10 хв, промивали у фізрозчині та готували суспензію, що відповідала показнику оптичної густини 0,3 при довжині хвилі 600 нм на фотоелектрокалориметрі (КФК-2УХЛ4,2). Суспензії інкубували при температурі 37°С, вимірюючи оптичну густину кожні 24 години протягом 5 діб. Автолітичну активність визначали як різницю між початковою та кінцевою і виражали у відсотках.

Результати та їх обговорення. Властивості мікробної поверхні та бактеріальних клітин загалом залежать не лише від внутрішніх генетичних факторів, а й від зовнішніх чинників, в тому числі і від складу поживного середовища. Неорганічні фосфати відіграють важливу функцію у життєдіяльності живих організмів та бактерій, зокрема. Вони є одним із джерел для синтезу нуклеїнових кислот, енергетичних еквівалентів, фосфоліпідів, тейхоєвих кислот, тощо. Відомо, що синтез тейхоєвих кислот залежить від джерела неорганічних фосфатів у середовищі культивування, які є одними із ключових складових компонентів даних молекул [2, 9]. Тому вирощування бактеріальних культур на середовищах із обмеженим вмістом фосфатів є одним із наукових підходів для опосередкованого з'ясування їх функцій. У процесі роботи було досліджено вплив K_2HPO_4, як джерела фосфату, у різних концентраціях на властивості бактерій, в яких можуть бути задіяні тейхоєві кислоти, а саме: гідрофобність, чутливість до дії антибіотиків, автолітичні властивості.

Гідрофобність бактеріальної поверхні – один із ключових факторів мікробної адгезії до епітелію макроорганізму. Дана фізико-хімічна характеристика є пов'язаною із ступенем полярності та зарядом клітинної стінки і залежить від властивостей її компонентів [7]. Тому було актуальним дослідити наявність залежності між вмістом фосфатів у середовищі та ступенем гідрофобності мікробних клітин.

У роботі використовувалися розчинники, що мають різні донорно-акцепторні властивості та полярність. Дослідження гідрофобності штамів *L. plantarum* 195D і 11/16 показали міжштамові відмінності. Гідрофобність штаму *L. plantarum* 11/16 при обробці хлороформом становила 25,8 ±3,8 %, тоді як штаму *L. plantarum* 195D – 53,9±1,87 %. Дані наведені на рис. 1. При використанні гексану також спостерігалася різниця у гідрофобності: для штаму *L. plantarum* 11/16 її значення дорівнювало 23,6±3,8 %, а для штаму *L. plantarum* 195D – 38,2±4,27%. Різниця у значеннях гідрофобності клітин при використанні етилацетату не виявилася достовірною ($p > 0,05$).

Обидва досліджувані штами по-різному реагували на зниження концентрації фосфату у середовищі, проявляючи різний ступіть спорідненості щодо розчинників.

На середовищі із третиною вмісту неорганічного фосфату (0,6 г/л) при обробці бактерій штаму *L. plantarum* 195D хлороформом було відмічено зниження досліджуваного показника на 15,3 %. У той же час, гідрофобність штаму *L. plantarum* 11/16 була незмінною.

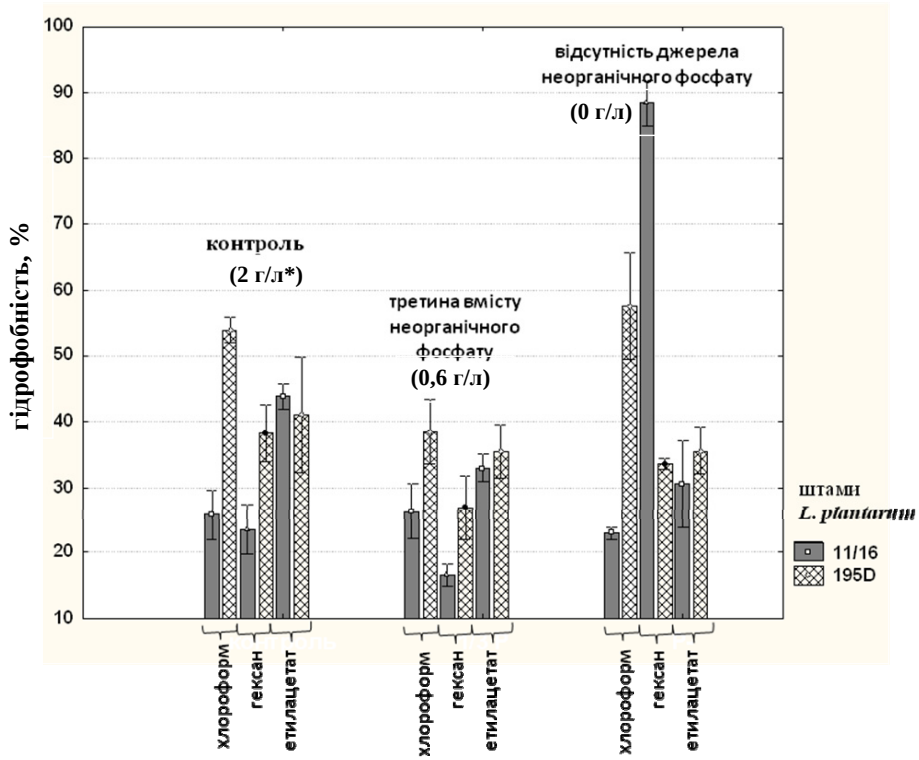


Рис.1. Вплив концентрації неорганічного фосфату в середовищі культивування на гідрофобність бактеріальних клітин

* в ролі джерела неорганічного фосфату використовували K_2HPO_4

На середовищі із третиною вмісту неорганічного фосфату гідрофобність при використанні гексану знижувалась на 9-11 % в обох штамів. При культивуванні штаму *L. plantarum* 11/16 на середовищі MRS із відсутністю неорганічного фосфату гідрофобність зростала на 64,8 %.

Гідрофобність бактерійної поверхні щодо етилацетату достовірно знижувалась на 7-10 % лише у випадку штаму *L. plantarum* 11/16. Порівнюючи отримані нами дані із даними інших авторів, можна зробити висновок, що досліджувані нами пробіотичні штами лактобацил не характеризуються високою гідрофобністю. Аналогічні дані отримали Perez із співавторами, які вказують на те, що для міжклітинних взаємодій показник гідрофобності повинен перевищувати 80 % [11]. У нашому випадку такий індекс був отриманий для штаму *L. plantarum* 11/16 із використанням гексану за умов відсутності джерела неорганічного фосфату. Ймовірно, в даному випадку можливий дефіцит тейхоєвих кислот у клітинних стінках бактерій спричинив підвищення спорідненості клітин до нейтрального розчинника за рахунок зменшення негативного заряду клітинної поверхні.

Зважаючи на акцепторну природу розчинника етилацетату, можна пояснити незначне зниження гідрофобності штаму *L. plantarum* 11/16 на середовищах, дефіцитних на неорганічні фосфати. При зменшенні кількості фосфатних груп, що є потенційними джерелами електронів, знижується потенціал взаємодії із речовинами-акцепторами, яким виступає розчинник етилацетат. На прикладі штаму *L. plantarum* 195D отримана нами закономірність не була статистично достовірною.

Таким чином, на гідрофобність пробіотичних штамів лактобацил впливає вміст неорганічного фосфату в середовищі культивування та тип розчинника. Ймовірно, в даному випадку має місце порушення синтезу тейхоєвих кислот, що відображається у зміні спорідненості мікробних клітин, вирощених на середовищах із різною концентрацією фосфатів до різних розчинників [5, 7].

Важливим було дослідити чутливість бактерій до антибіотиків залежно від вмісту фосфату у середовищі культивування з метою оцінки функціонального стану клітин при зміні умов їх інкубації та визначення ступеню залучення тейхоєвих кислот у даний процес.

Досліджувані штами лактобацил виявилися стійкими до дії лінкоміцину, цефазоліну, стрептоміцину, гентаміцину, норфлоксацину, ципрофлоксацину, ванкоміцину, тетрацикліну та доксицикліну. Штам *L. plantarum* 11/16 був чутливий до кліндаміцину, рокситроміцину та меропенему, тоді коли штам *L. plantarum* 195D – до рокситроміцину, рифампіцину і меропенему. Штами проявляли проміжну чутливість до фуразолідону, кліндаміцину і цефтріаксону.

Як видно із табл. 1, стосовно деяких антибіотиків відбувається зміна чутливості при культивуванні бактерій на середовищах із різним вмістом джерела неорганічного фосфору.

Таблиця 1

Відношення лактобацил до дії антибіотиків на середовищах MRS із різним вмістом неорганічного фосфату, K_2HPO_4.

Назва антибіотика	*L. plantarum* 11/16			*L. plantarum* 195D		
	контроль	0,6 г/л	0 г/л	контроль	0,6 г/л	0 г/л
Фузидин	П	С	С	П	П	С
Фуразолідон	Ч	С	С	П	П	П
Лінкоміцин	С	С	С	С	С	С
Кліндаміцин	Ч	Ч	Ч	П	П	П
Цефазолін	С	С	С	С	С	С
Цефтріаксон	С	П	Ч	П	П	П
Стрептоміцин	С	С	С	С	С	С
Гентаміцин	С	С	С	С	С	С
Норфлоксацин	С	С	С	С	С	С
Рокситроміцин	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч
Ципрофлоксацин	С	С	С	С	С	С
Рифампіцин	Ч	П	С	Ч	Ч	Ч
Ванкоміцин	С	С	С	С	С	С
Тетрациклін	С	С	С	С	С	С
Доксициклін	С	С	С	С	С	С
Меропенем	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч

Примітка: Ч- чутливість до дії антибіотику, П – проміжна чутливість, С – стійкість

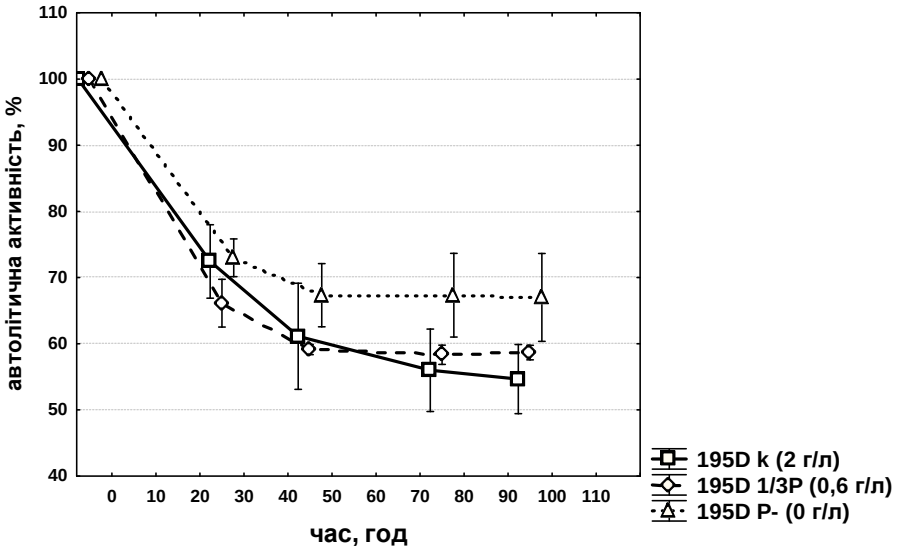
У міру зменшення у середовищі концентрації неорганічних фосфатів знижувалась чутливість обох штамів щодо дії фузидину. Таке зниження мало місце і щодо фуразолідону, але лише у штаму *L. plantarum* 11/16. Крім того, при зменшенні концентрації неорганічного фосфату відбувалося підвищення чутливості даного штаму до цефтріаксону і зниження – до рифампіцину.

Можна припустити на прикладі зниження чутливості до фузидину, фуразолідону та рифампіцину, що можливий дефіцит тейхоєвих кислот у клітинних стінках досліджуваних бактерій відобразився у зниженні чутливості до позитивно заряджених антимікробних агентів (катіонних антибіотиків) [7]. Підвищення чутливості до цефтріаксону можна пояснити спрямованістю його дії на синтез клітинної стінки, яка в умовах нестачі джерела фосфатів є менш стійкою до дії зовнішніх факторів [5].

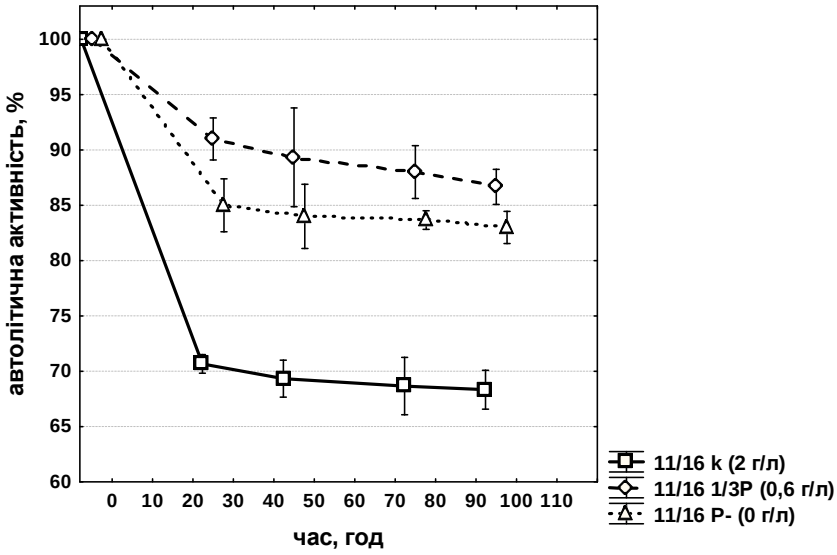
Таким чином, відбувається зміна чутливості бактеріальних клітин до дії деяких антибіотиків. Це може свідчити як про зміну поверхневих характеристик мікробних клітин, що проявляється у ступені зв'язування антимікробного агента із клітиною, так і про зміну ригідності власне клітинної стінки внаслідок можливого порушення синтезу тейхоєвих кислот [8].

Ще одним важливим етапом дослідження ролі фосфатів у властивостях мікробної поверхні та залучення у них тейхоєвих кислот було вивчення автолітичної активності. Принцип зв'язування позитивно зарядженого автолітичного ферменту та полімеру тейхоєвої кислоти, що несе негативний заряд, лежить в основі взаємодії автолізинів і тейхоєвих кислот, при чому істотну роль у цьому процесі відіграє щільність негативного заряду останніх молекул [13]. Відомо, що тейхоєві кислоти можуть брати участь у регуляції автолітичних ферментів у процесі їх дії на бактеріальну клітину, однак, нез'ясованим є вплив концентрації в середовищі неорганічного фосфату, як фактору нормального синтезу тейхоєвих кислот.

При проведенні даних досліджень з'ясувалося, що концентрація неорганічного фосфату по-різному впливала на досліджувані пробіотичні штами лактобацил (рис. 2.). При дослідженні штаму *L. plantarum* 195D у перші три доби достовірної різниці у ступені автолізу не спостерігалося. На четверту добу ступінь автолізу бактерій, культивованих за умов повної відсутності джерела неорганічного фосфату, був на 12 % вищим порівняно із контрольним зразком, що свідчить про відсутність, чи дуже низький ступінь участі тейхоєвих кислот у регуляції автолітичних процесів досліджуваного пробіотичного штаму лактобацил.



а)



б)

Рис. 2. Вплив концентрації неорганічних фосфатів у середовищі культивування на автолітичну активність штамів лактобацил, а) *L. plantarum* 195D, б) *L. plantarum* 11/16
k – контроль (концентрація K_2HPO_4 – 2 г/л), 1/3P - клітини, вирощені на середовищі із третиною вмісту неорганічного фосфату (концентрація K_2HPO_4 – 0,6 г/л), P- – клітини, вирощені із повною відсутністю неорганічного фосфату (концентрація K_2HPO_4 – 0 г/л).

При вивченні автолізу штаму *L. plantarum* 11/16 різниця між зразками, що вирощували за умов різної концентрації фосфатів, була більш суттєвою. Ступінь автолізу бактерійної суспензії, отриманої із поживного середовища із повною відсутністю фосфату, відрізнявся

від контрольного зразка в середньому на 15 %, тоді, коли різниця із зразком, що відповідав третині джерела фосфату, становила в середньому 20 % у сторону зменшення автолітичної активності. Це можна пояснити зменшенням сумарного негативного заряду тейхоєвої кислоти за рахунок дефіциту фосфатів, що може бути ймовірною причиною зменшення ефективності зв'язування автолітичних катіонних ферментів та призводити до зниження автолітичної активності бактеріальної суспензії штаму *L. plantarum* 11/16 [3, 13].

Таким чином, можна припустити, що тейхоєві кислоти пробіотичних штамів лактобацил беруть участь у регуляції автолітичних ферментів. Залежність даного процесу від концентрації неорганічного фосфату у середовищі культивування має штамоспецифічний характер.

Слід однак зазначити, що застосовані методи не дозволяють однозначно стверджувати, що отримані ефекти обумовлені саме дефектом синтезу тейхоєвих кислот. Однак, опираючись на дані літератури, можна із високим ступенем ймовірності стверджувати, що результати опосередкованого дослідження участі тейхоєвих кислот у гідрофобності клітинної поверхні, антибіотикочутливості та автолітичній активності шляхом обмеження концентрації неорганічних фосфатів підтверджують припущення, що має місце саме пригнічення синтезу аніонних біомолекул клітинної стінки. Отримані дані дозволяють розширити уявлення про роль фосфатів у проявах фізіологічних властивостей пробіотичних штамів лактобацил та механізми їх регуляції.

О.П. Ливинская, И.Л. Гармашева, Н.К. Коваленко

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, Киев

ВЛИЯНИЕ НЕОРГАНИЧЕСКОГО ФОСФАТА НА СВОЙСТВА ПРОБИОТИЧЕСКИХ ШТАММОВ ЛАКТОБАЦИЛЛ

Р е з ю м е

Исследовано влияние неорганических фосфатов среды культивирования на гидрофобность микробной поверхности, чувствительность бактерий к действию антибиотиков и их аутолитическую активность. Недостаток неорганического фосфата снижал аффинность бактериальных клеток к хлороформу, этилацетату, гексану. Полное исключение неорганического фосфата вызывало повышение аффинности штамма *Lactobacillus plantarum* 11/16 к гексану. Аутолитическая активность штамма *L. plantarum* 195D не зависела от концентрации неорганического фосфата, тогда как ее уменьшение снижало на 15-20 % аутолиз штамма *L. plantarum* 11/16. Показано снижение антибиотикочувствительности лактобацилл по отношению к действию фузидина, фуразолидона и рифампицина. В то же время, ограничение содержания источника неорганических фосфатов в среде культивирования повышало антибиотикочувствительность по отношению к цефтриаксону.

К л ю ч е в ы е с л о в а: неорганические фосфаты, пробиотические свойства, тейхоевые кислоты, гидрофобность, антибиотикочувствительность, аутолитическая активность.

O.P. Livinska, I.L. Garmasheva, N.K. Kovalenko

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

EFFECT OF INORGANIC PHOSPHATE ON THE PROPERTIES OF LACTOBACILLI PROBIOTIC STRAINS

S u m m a r y

The effect of inorganic phosphate in the culture medium on microbial surface hydrophobicity, susceptibility to antibiotics and its autolytic activity has been investigated. The limitation of inorganic phosphate reduced affinity of bacterial cells to chloroform, ethyl acetate and hexane. The total elimination of inorganic phosphate caused an increase of the affinity of *Lactobacillus plantarum* strain 11/16 to hexane. Autolytic activity of the strain *L. plantarum* 195D did not depend on the concentration of inorganic phosphate, whereas its decrease reduced autolysis of the strain *L. plantarum* 11/16 by 15-20% Antibiotic susceptibility decrease of lactobacilli towards to the effect of fuzidin, furazolidone and rifampicin was shown. At the same time, limitation of inorganic phosphate source in the culture medium increased the antibiotic sensitivity towards ceftriaxone.

The paper is presented in Ukrainian

K e y w o r d s: inorganic phosphates, probiotic properties, teichoic acid, hydrophobicity, antibiotic sensitivity, autolytic activity.

T h e a u t h o r's a d d r e s s: *Livinska O.P.,* Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D03680, Ukraine.

1. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам (Методические указания МУК 4.2.–1890-04) // Клин. Микробиол. Антимикроб. Химиотер. – 2004. – **6**, № 4. – С. 306–359.
2. *Потехина Н. В*. Тейхоевые кислоты актиномицетов и других грамположительных бактерий // Успехи биологической химии. – 2006. – **46**. – С. 225–278.
3. *Biswas R, Martinez R.E., Göhring N., Schlag M., Josten M., Xia G., Hegler F., Gekeler C., Gleske A.K., Götz F., Sahl H.G., Kappler A., Peschel A.* Proton-binding capacity of *Staphylococcus aureus* wall teichoic acid and its role in controlling autolysin activity // PLoS One. – 2012. – **7**, N 7. – P. 414–415.
4. *Chen L.C., Chiang W.D., Chen W.C., Chen H.H., Huang Y.W., Chen W.J., Lin S.B.* Influence of alanine uptake on *Staphylococcus aureus* surface charge and its susceptibility to two cationic antibacterial agents, nisin and low molecular weight chitosan // Food Chem. – 2012. –**135**, N 4. – P. 2397–2403.
5. *Clarke-Sturman A.J., Archibald A.R., Hancock I.C.* Cell wall assembly in *Bacillus subtilis*: partial conservation of polar wall material and the effect of growth conditions on the pattern of incorporation of new material at the polar caps // J. Gen. Microbiol. – 1989. – **135**, N 3. – P. 657–665.
6. *De Mann, J.D., Rogosa M., Sharpe M.E.* A medium for the cultivation of lactobacilli // J. Appl. Bact. – 1960. – **23**. – P. 130–135.
7. *Giaouris E, Chapot-Chartier MP, Briandet R.* Surface physicochemical analysis of natural *Lactococcus lactis* strains reveals the existence of hydrophobic and low charged strains with altered adhesive properties // Int J. Food Microbiol. – 2009. – **131**, N1. – P. 2–9.
8. *Giaouris E., Briandet R., Meyrand M.* Variations in the degree of D-alanylation of teichoic acid in *Lactococcus lactis* after resistance to cationic antimicrobials but have no effect on bacterial surface hydrophibicity and charge // Appl. Environ. Microbiol. – 2008. – **74**, N 15. – P. 4764–4767.
9. *Kruyssen F.J., de Boer W.R., Wouters J.T.* Cell wall metabolism in *Bacillus subtilis* subsp. niger: effects of changes in phosphate supply to the culture // J. Bacteriol. – 1981. – **146**, N 3. – P. 867–876.
10. *Lebeer S., Verhoeven T., Velez M., Vanderleyden J., Keersmaecker S.* Impact of environmental and genetic factors on biofilm formation by the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG // Appl. Environ. Microbiol. – 2007. – **73**, N 21 – P. 6768–6775.
11. *Perez P*., Minnaard Y., Disalvo E., Antoni G. Surface properties of bifidobacterial strains of human origin // Appl. and Env. Microbiol. – 1998. – **64**, N 1. – P. 21–26.
12. *Vitković L.* Wall turnover deficiency of *Bacillus subtilis* Ni15 is due to a decrease in teichoic acid // Can J. Microbiol. – 1987. – **33**, N 6. – P. 566–568.
13. *Wecke J., Perego M., Fischer W*. D-alanine deprivation of *Bacillus subtilis* teichoic acids is without effect on cell growth and morphology but affects the autolytic activity // Microb. Drug Resist. – 1996. – **2**, N 1. – P. 123–129.

Отримано 14.05.2013