

УДК 632.95

ДЕГРАДАЦИЯ ГЕРБИЦИДА ГЛИФОСАТА БАКТЕРИЯМИ РОДОВ PSEUDOMONAS И PROTEUS

¹Бакулин М.К., ²Овсянников Ю.С., ¹Туманов А.С., ¹Бакулин В.М.

¹ФГБОУ ВПО «Вятский государственный университет», Киров, e-mail: vladbakulin@rambler.ru;

²ФГБОУ ВПО «Вятская государственная сельскохозяйственная академия», Киров

В статье представлены экспериментальные данные, свидетельствующие о перспективности использования культур глифосатустойчивых изолятов протеобактерий *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Pseudomonas fluorescens*, выделенных из загрязненных фосфонатом N-фосфометилглицином (глифосатом) почв сельскохозяйственных предприятий, в биотехнологических процессах глубинного культивирования и деградации этого ксенобиотика. Показано, что протеобактерии родов *Pseudomonas* и *Proteus* обладают способностью к биодegradации фосфометилглицина и других фосфонатов, используя для этого несколько путей. Широкое распространение гербицида глифосата с химически стабильной углерод-фосфорной связью среди ксенобиотиков, загрязняющих окружающую среду, вызывает большой интерес к изучению путей и механизмов их биодegradации. В статье показано, что добавление глифосатрезистентных протеобактерий родов *Pseudomonas* и *Proteus* в жидкую среду с 150-600 мкг·см⁻³ фосфоната N-фосфометилглицина при глубинном культивировании приводит к увеличению уровней синтеза биомассы и биотехнологического процесса деструкции глифосата.

Ключевые слова: бактерии, биодegradация, глифосат, ксенобиотики, глубинное культивирование

DEGRADATION HERBICIDES GLYPHOSATE BY BACTERIA GENERA PSEUDOMONAS AND PROTEUS

¹Bakulin M.K., ²Ovsyannikov Y.S., ¹Tumanov A.S., ¹Bakulin V.M.

¹FGBOU VPO «Vyatka State University», Kirov, e-mail: vladbakulin@rambler.ru;

²FGBOU VPO «Vyatka State Agricultural Academy», Kirov

In the article presented the experiment data of the perspectives of using glyphosateresistant isolates of the proteobacteria *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Pseudomonas fluorescens* from agricultural soil polluted with phosphonates N-phosphonomethylglycine (glyphosate), in biotechnological processes of deep cultivating and degradation that xenobiotics. Proteobacteria by Genera *Proteus* and *Pseudomonas* were shown to have the capability for biodegradation of phosphonomethylglycine and other phosphonates with the use of several pathways. Intensive study of the pathways and mechanisms of their biodegradation is required due to the abundance of herbicides glyphosate with a chemically stable carbon-phosphorus bond among xenobiotics contaminating the environment. The article illustrates that addition to the liquid media with 150-600 mcg · sm⁻³ phosphonates N-phosphonomethylglycine during the Genera *Pseudomonas* and *Proteus* kind a glyphosateresistant proteobacteria deep cultivation leads to the increase biomass synthesis level and glyphosate-destructing biotechnological process.

Keywords: bacteria, biodegradation, glyphosate, xenobiotics, deep cultivating

Синтетические фосфонаты являются основой многих ксенобиотиков и широко распространены среди химических веществ антропогенного происхождения, среди которых: отравляющие вещества, создаваемые в качестве химического оружия – VX, зарин и зоман; гербицид глифосат (фосфометилглицин); производные этил- и фенилфосфонатов, используемые как инсектициды; алафосфалин и фосфономицин (бисфосфонаты) – антибиотики; циклические эфиры ароматических бисфосфонатов – полимерные добавки; фирол 76 – пламягаситель, полиаминополифосфоновые кислоты – ингибиторы коррозии [1–3].

Однако наиболее широко используемым в мире фосфонатом является гербицид системного действия глифосат, который служит основой более трех десятков препаратов, выпускаемых под разными фирменными названиями и потребляемых в больших количествах (только в США ежегодно применяется

около – 22000 т этого гербицида, производимого известными фирмами «Монсанто», «Дау Агро Сайэнс» и др., в Украине – 1500 т) [цит. по 4]. Использование биологических методов утилизации токсичных фосфонатов, к которым относится и глифосат, отходов их производства и продуктов разложения, рассматривается российскими и зарубежными специалистами в качестве главной альтернативы физическим и химическим методам защиты окружающей среды от токсикантов этого типа [1, 2].

В этом плане актуальными являются исследования, проводимые вятскими биотехнологами и микробиологами (ВятГУ и ВГСА) и по созданию биологических консорциумов на основе штаммов-биодеструкторов, разработке новых биотехнологических подходов комплексного использования их для уничтожения ксенобиотиков, в том числе фосфонатов, в природных и искусственных средах [5–7].

Практический интерес представляет использование глифосатустойчивых изолятов протеобактерий, выделенных из почвы в местах интенсивного использования глифосата, в биотехнологии деградации фосфонометилглицина.

Целью настоящей работы являлась сравнительная оценка эффективности разложения глифосата почвенными изолятами протеобактерий.

Материалы и методы исследования

Для тестирования чувствительности псевдомонад к глифосату использовали препарат Раундап («Монсанто», США), содержащий 36 % глифосата.

Изоляты микроорганизмов. В работе использованы вновь выделенные изоляты протеобактерий *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas alcaligenes* и ранее выделенный изолят *P. fluorescens* с типичными родовыми и видовыми свойствами, в качестве контролей – ранее описанные изоляты бактерий, выделенные сотрудниками ВятГУ [5, 6].

Питательные среды. Для выращивания микроорганизмов использовали плотную питательную среду, содержащую: картофельный крахмал – 1,0%; соевую муку – 3,0%; $(\text{NH}_4)_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$ – 0,6%; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,4%; CaCO_3 – 0,8%; K_2HPO_4 – 0,01%; глюкозы – 2,0%; агара – 2%, воды водопроводной до 100% и жидкую среду того же состава – без агара «соевая среда». Для стерилизации сред и почв использовали их автоклавирование при 121 °C в течение 1 часа.

Микробиологические методы

Количественный анализ содержания **глифосата** в почве и других исследуемых средах определяли методом газо-жидкостной хроматографии на хроматографе Shimadzu – QP 2010 с масс-селективным детектором (химическая ионизация) с использованием в качестве контроля растворов коммерческого **препарата** Раундап («Монсанто», США). Ионизирующее напряжение – 70 э.в., температура источника ионов 200 °C, в диапазоне массовых чисел 39–520 а.е.м. Хроматографическое разделение производных глифосата проводили на кварцевой капиллярной колонке с фазой Equity («Supelco», США) при температуре от 120 до 290 °C. Температура инжектора составляла 270 °C. Масс-спектрометрией с химической ионизацией подтверждали молекулярную массу глифосата. В качестве газа-реагента использовали метан особой чистоты (99,9995 %). Предел обнаружения метода для глифосата в исследуемых средах составлял 5 нг·см⁻³. Для приготовления растворов, используемых в соответствии с инструкцией к хроматографу, при получении экстрактов из сред и приготовления подвижной фазы использовали реактивы квалификации «ХЧ».

Определение групповой принадлежности почвенных микроорганизмов, определение обсемененности и выделение чистых микробных культур проводили общепринятыми методами [8–12].

В качестве посевного материала использовали двухсуточные культуры бактерий, выращенные на плотной среде при температуре 24–28 °C. Культуры, выросшие на плотной среде, смывали физиологическим раствором и разводили до концентрации $1,5 \cdot 10^9$ бактерий в см³.

В колбы Эрленмейера объемом 500 мл вносили по 62,5; 250,0 и 1000,0 мкл препарата Раундап (22,5;

90,0 и 360,0 мг глифосата), затем готовой жидкой средой доводили объем рабочей смеси в колбах до 140 см³ и вносили по 10,0 см³ исследуемых посевных культур. Конечная концентрация бактерий в среде при посеве составляла $1,0 \cdot 10^8$ протеобактерий в см³, глифосата – 150 и 600 мкг·см⁻³. Выращивание вели при температуре 24–28 °C на шуттеле со скоростью вращения платформы 250 об/мин. Через 24 ч культивирования проводили определение количества живых бактерий в средах путем посева серийных разведений на плотные среды. Родовую и видовую принадлежность выделяемых получаемых микробных культур проводили с использованием идентификационных тест-систем (наборов) МИКРО-ЛА-ТЕСТ, производства PLIVA – Lachema (Чехия) и прилагаемых к ним Code book [12].

Результаты исследования и их обсуждение

Культуры протеобактерий *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas alcaligenes* были выделены и идентифицированы при исследовании микробной обсемененности проб почвы, отобранных на участках сельхозугодий в Оричевском и Нововятском районах Кировской области, которые многократно подвергались воздействию **глифосата** [5]. При каждой обработке **методом распыления** расход на 100 м² поля, предназначенного под посев овощных культур и картофеля, в среднем составлял 5 литров водного раствора, содержащего 65–70 мл 36 % **глифосата**.

В августе 2013 г. было отобрано четыре группы образцов почвы по 5 проб в каждой: 1 группа – образцы почвы, не обрабатываемой ранее гербицидами (контроль почвы перед обработкой **глифосатом**); 2 группа – образцы почвы, обработанной однократно в июле 2013 г., с последней обработки до взятия пробы прошел один месяц; 3 группа – образцы почвы, обработанной 11 раз в предшествующие пять лет (2008–2012 гг.) в весенне-летний период, при этом с последней обработки прошел год; 4 группа – пробы почвы, обработанной 11 раз в предшествующие пять лет (2008–2012 гг.) в весенне-летний период и дополнительно – однократно в июле 2013 г., с последней обработки до взятия проб прошел один месяц.

Результаты анализов свидетельствовали, что общее количество микроорганизмов менялось в зависимости от количества обработок гербицидом, так, в 1 группе (контрольной) образцов почвы средняя численность микроорганизмов составляла $8 \cdot 10^5$ КОЕ·г⁻¹, в 2–4 группах $5 \cdot 10^2$; $9 \cdot 10^4$; $2 \cdot 10^4$ КОЕ·г⁻¹ соответственно (рис. 1).

Полученные результаты свидетельствуют, что обработка гербицидом почвы приводит к резкому снижению плотности микроорганизмов в ней. Через месяц после однократной обработки **глифосатом** ко-

личество микроорганизмов в исследуемых образцах почвы было меньше в 1600 раз в сравнении с контрольными. Через год после многократной (11 раз в течение 5 лет) обработки гербицидом содержание микро-

организмов в почве в значительной степени восстановилось, но было ниже, чем в контроле, примерно в 8,9 раза. В этом случае, по-видимому, сказывалось накопление глифосата и продуктов его разложения в почве.

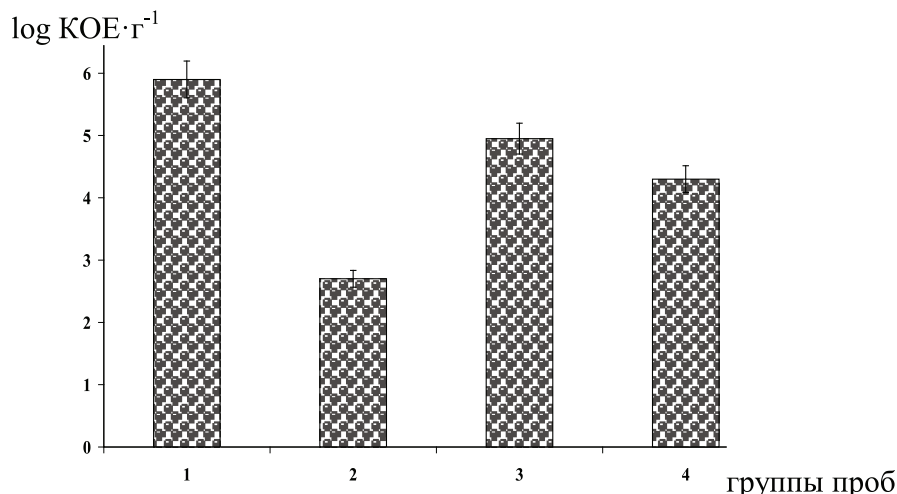


Рис. 1. Содержание общего количества микроорганизмов (log колониеобразующих единиц – log KOE) в 1 г проб почвы:
 1 – не подвергавшейся воздействию глифосата (контроль до воздействия гербицидом);
 2 – обработанной однократно в июле 2013 г., за месяц до отбора и анализа проб;
 3 – подвергавшейся воздействию глифосата 11 раз в течение предшествующих пяти лет (2008–2012 гг.); 4 – подвергавшейся воздействию фосфонометилглицина 11 раз в течение предшествующих пяти лет (2008–2012 гг.) и 1 раз в 2013 г., за месяц до отбора и анализа проб

Результаты определения общего количества микроорганизмов в четвертой группе проб показали, что микрофлора почвы, регулярно подвергавшейся обработке глифосатом, стала устойчива к повторным воздействиям гербицида и быстрее восстанавливалась. Об этом свидетельствуют результаты сравнительного анализа через месяц после обработки глифосатом образцов проб почвы, многократно подвергавшейся воздействию глифосата в предшествующие годы и первично обработанной глифосатом, среднее содержание микроорганизмов в об-

разцах проб почвы группы 4 было в 50 раз выше, чем в образцах почвы группы 2.

В ходе исследований образцов почвы, многократно обработанных глифосатом (12 раз в течение 6 лет), были выделены и идентифицированы по 6 изолятов бактерий видов *Pseudomonas alcaligenes* и 4 изолята *Proteus vulgaris*, которые наряду с ранее выделенными [5] изолятами *P. fluorescens* обладали повышенной устойчивостью к токсическому действию глифосата в сравнении с контрольными лабораторными изолятами, не контактировавшими с гербицидом (табл. 1).

Таблица 1
 Распределение изолятов бактерий по уровням устойчивости к глифосату

Видовая принадлежность культур бактерий	Количество изолятов (из числа выделенных), способных к росту в жидкой питательной среде с глифосатом в концентрации..., мкг·см ⁻³			
	0,006	0,025	0,1	0,4
<i>P. alcaligenes</i>	–	1	3	2
<i>Pr. vulgaris</i>	–	2	1	1
<i>P. fluorescens</i> *	–	–	5	2
<i>P. alcaligenes</i> 214**	1	–	–	–
<i>Pr. vulgaris</i> MC 12**	1	–	–	–
<i>P. fluorescens</i> 1457**	1	–	–	–

Примечания: * культуры изолятов, выделенные ранее [5];

** культуры изолятов, ранее не контактировавшие с гербицидом.

При этом 3 из вновь выделенных 10 изолятов *P. alcaligenes* и *Pr. vulgaris* (30 %) были способны к росту в жидкой среде, содержащей 0,4 мкг/см³ глифосата, 4 изолята (40 %) и 3 изолята (30 %) бактерий были способны к росту в жидкой среде, содержащей соответственно 0,1 и 0,025 мкг·см⁻³ фосфометилглицина.

На основе первичных изолятов, устойчивых к 0,4 мкг·см⁻³ глифосата, в результате восьми пересевов культур в жидкой соевой среде с возрастающими концентрациями глифосата и отбора наиболее устойчивых клонов были выделены клоновые культуры *Pr. vulgaris* 3/8, *P. alcaligenes* 5/8

и *P. fluorescens* 047/8 с резистентностью к 50, 110 и 250 мкг·см⁻³ глифосата соответственно (рис. 2).

Как видно из данных, представленных на рис. 2, при равной исходной чувствительности к глифосату нарастание устойчивости к нему у изолята псевдомонад вида *P. fluorescens* происходило более интенсивно, чем у изолята вида *P. alcaligenes* и вульгарного протей. В результате 8 пассажей на средах с возрастающими концентрациями глифосата культура *P. fluorescens* 047/8 повысила уровень устойчивости первичного изолята в 625 раз, в то время как культура *P. alcaligenes* 5/8 – в 275 раз, культура *Pr. vulgaris* 3/8 – в 125 раз.

Уровень устойчивости, мкг·см⁻³

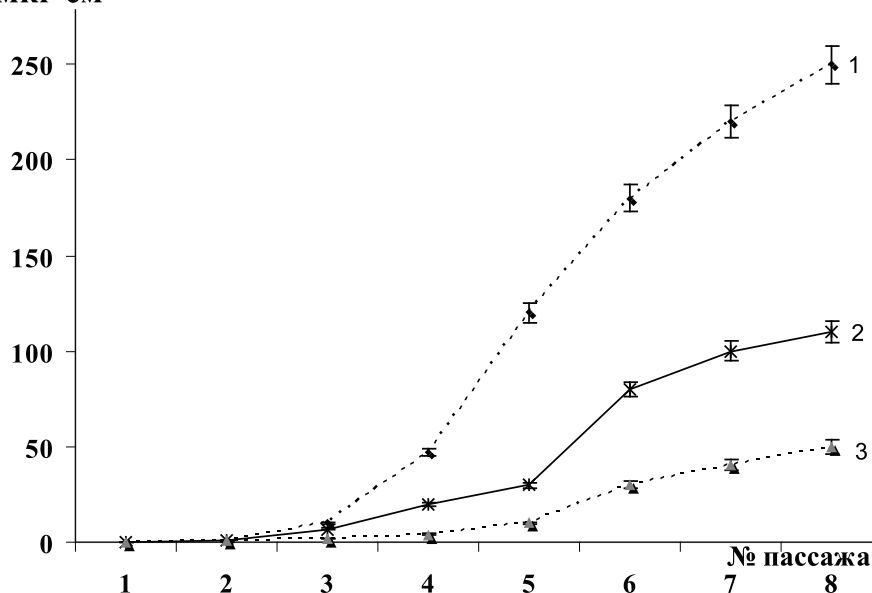


Рис. 2. Изменение уровней устойчивости бактерий в процессе восьми пассажей культур изолятов на среде с возрастающими концентрациями глифосата:
1 – *P. fluorescens* 047/8; 2 – *P. alcaligenes* 5/8; 3 – *Pr. vulgaris* 3/8

На следующем этапе исследований, представлялось целесообразным оценить возможность использования глубинных культур полученных вариантов в процессах деструкции глифосата в лабораторных условиях глубинного культивирования и при их интродукции в контаминированную данным гербицидом почву.

При глубинном культивировании всех трех исследуемых культур и их исходных изолятов в «соевой среде» без гербицида при посевной концентрации $1,0 \cdot 10^8$ КОЕ·см⁻³ через сутки их концентрация составляла $(4,9-6,2) \cdot 10^9$ КОЕ·см⁻³ (табл. 1). Внесение в среду 150 мкг·см⁻³ глифосата сопровождалось снижением

исходной концентрации бактерий после засева в случае культур вариантов *Pr. vulgaris* 3/8 и *P. alcaligenes* 5/8 до $0,3 \cdot 10^6$ и $0,4 \cdot 10^8$ КОЕ·см⁻³, при этом концентрация глифосата в среде, снижалась на 26,7–50,0%. Культура *P. fluorescens* 047/8 была способна расти на среде содержащей 150 мкг·см⁻³ гербицида, при этом она способствовала инактивации за сутки 90% гербицида, хотя концентрация бактерий повысилась за сутки только до $3,8 \cdot 10^9$ КОЕ·см⁻³, что в 1,6 раз ниже, чем в среде без глифосата. Следует отметить, что 6,7% глифосата в контрольных средах инактивировалось без участия бактерий и при высева исходных изолятов (табл. 2).

Таблица 2

Инактивация глифосата в жидкой «соевой среде»
при глубинном культивировании протеобактерий

Микроорганизм	Концентрация глифосата в жидкой среде, мкг·см ⁻³		Содержание живых бактерий в среде через 24 ч, КОЕ·см ⁻³
	исходная	после культивирования (% от исходной)	
<i>P. fluorescens</i> 047/8	0	0	6,2·10 ⁹
	150	15 (10,0)	3,8·10 ⁹
	600	200 (33,3)	0
<i>P. fluorescens</i> 047 (исходный изолят)	0	0	6,1·10 ⁹
	150	140 (93,3)	0
<i>P. alcaligenes</i> 5/8	0	0	4,9·10 ⁹
	150	75 (50,0)	0,4·10 ⁸
	600	450 (75)	0
<i>P. alcaligenes</i> 5 (исходный изолят)	0	0	4,7·10 ⁹
	150	140 (93,3)	0
<i>Pr. vulgaris</i> 3/8	0	0	5,7·10 ⁹
	150	110 (73,3)	0,3·10 ⁶
	600	510 (85,0)	0
<i>Pr. vulgaris</i> 3 (исходный изолят)	0	0	5,5·10 ⁹
	150	140 (93,3)	0
Контроль (инактивация гербицида в среде без бактериальных культур)	150	140 (93,3)	—
	600	560 (93,3)	—

Далее был поставлен эксперимент по контаминации образцов стерильной почвы (рН 6,7) глифосатом из расчета 2400 мкг·см⁻³ с последующей инокуляцией в нее глубинной культуры *P. alcaligenes* 5/8, выращенной в «соевой среде» с 150 мкг·см⁻³ глифосата, до конечной концентрации в почве 1,0·10⁸ КОЕ·см⁻³. В качестве контроля была использована та же почва без инокуляции микробной культуры. Уже через 5 часов после инокуляции глифосата в почве с внесенной в нее культурой *P. alcaligenes* 5/8 глифосат не определялся, в то время как в контрольных образцах его содержание в этот период снизилось за счет связывания частицами почвы, действия почвенных солей и других факторов только до 1200–1400 мкг·см⁻³.

Следует отметить, что период нормального полураспада глифосата в почве в зависимости от типа почв, как было установлено специалистами US EPA, находится составляет от 3 до 130 дней [13].

Выводы

1. В результате 8 пассажей на средах с возрастающими концентрациями глифосата получены варианты *Pr. vulgaris* 3/8, *P. alcaligenes* 5/8 и *P. fluorescens* 047/8 с резистентностью к 50, 110 и 250 мкг·см⁻³

глифосата, что превышает уровни устойчивости первичных изолятов (исходных культур) в 125; 275 и 625 раз соответственно.

2. Инокуляция культуры варианта *P. alcaligenes* 5/8 в концентрации 1,0·10⁸ КОЕ см⁻³ в стерильные образцы почвы, содержащей 2400 мкг·см⁻³ глифосата, привела к тому, что гербицид в почве не определялся уже через 5 часов, что свидетельствует о возможности создания с использованием данной глифосатрезистентной культуры специальных препаратов для ремедиации загрязненных этим ксенобиотиком почв.

Список литературы

1. Бакулин В.М. Выделение бактерий рода *Pseudomonas* из почвы, загрязненной ксенобиотиком фосфометилглицином / В.М. Бакулин, Е.А. Мартинсон, М.К. Бакулин, Н.С. Мячина, Ю.С. Овсянников // Ветеринарная медицина. – 2012. – № 1. – С. 9–11.
2. Бакулин М.К. Интенсификация биодegradации нефти и нефтепродуктов под влиянием перфтордекалина // Прикл. биохимия и микробиология. – 2004. – Т. 40, № 3. – С. 317–322.
3. Бакулин М.К. Влияние перфтордекалина и карбогала на рост микроорганизмов-нефтедеструкторов в ассоциации с азотобактером на жидкой синтетической среде с нефтью / М.К. Бакулин, А.Ю. Плетнева, А.С. Грудцына, Л.В. Бакулина // Биотехнология. – 2006. – № 6. – С. 44–50.
4. Виноградский С.Н. Микробиология почв. – М.: Изд-во АН СССР, 1952. – 370 с.

5. Ефременко Е.Н. Экологически безопасная биодegradация реакционных масс, образующихся при уничтожении фосфорорганических отравляющих веществ // Е.Н. Ефременко, Н.В. Завьялова, Д.А. Гудков, И.В. Лягин и др. // Рос. хим. ж. (Ж. Рос. хим. об-ва им. Д.И. Менделеева). – 2010. – Т. 54, № 4. – С. 19–24.
6. Жариков М.Г. Изучение влияния глифосатсодержащих гербицидов на агроценоз / М.Г. Жариков, Ю.Я. Спиридонов // Агрохимия. – 2008. – № 8. – С. 81–89.
7. Звягинцев Д.Г. Биология почв / Д.Г. Звягинцев, И.П. Бабьева, Г.М. Зенова. – М.: Изд-во МГУ, 2005. – 445 с.
8. Кононова С.В. Фосфонаты и их деградация микроорганизмами / С.В. Кононова, М.А. Несмеянова // Биохимия. – 2002. – Т. 67, Вып. 2. – № 6. – С. 220–233.
9. Кузнецова Е.М. Глифосат: поведение в окружающей среде и уровни остатков / Е.М. Кузнецова, В.Д. Чмиль // Современные проблемы токсикологии. – 2010. – № 1. – С. 87–95.
10. Клисенко М.А. Методы определения микроколичеств пестицидов в продуктах питания, кормах и внешней среде. Справочник в 2 т. // М.А. Клисенко, А.А. Калинина, Г.А. Холькова. – М.: Колос, 1992. – Т. 1. – 567 с.
11. ЛАХЕМА, Брно, Чешская Республика: diagnostics@lachema.cz, http://www.lachema.cz.
12. Pesticide Fact Handbook: US EPA. Noyes Data Corporation // Park Ridge, New Jersey. – 1990. – Vol. 2. – P. 301–312.
13. Evans, C.G.T. Methods in Microbiology // C.G.T. Evans, D. Herbert, D. Tempest. – 1970. – P. 277–327.
14. Ju. Pletneva, A.S. Grud-cyna, L.V. Bakulina // Biotechnologija. 2006, no. 6. pp. 44–50.
15. 4. Vinogradskij S.N. Mikrobiologija pochvy // M.: Izd-vo AN SSSR, 1952. 370 p.
16. 5. Efremenko E.N. Jekologicheski bezopasnaja biodegradacija reak-cionnyh mass, obrazujushhihsja pri unichtozhenii fosfororganicheskikh otrav-ljajushhih veshhestv // E.N. Efremenko, N.V. Zav'jalova, D.A. Gudkov, I.V. Ljagin i dr. // Ros. him. zh. (Zh. Ros. him. ob-va im. D.I. Mendeleeva). 2010, T.54, no. 4. pp. 19–24.
17. 6. Zharikov M.G. Izuchenie vlijanija glifosatsoderzhashhih gerbici-dov na agrocenoz / M.G. Zharikov, Ju.Ja. Spiridonov // Agrohimiya. 2008. no. 8. pp. 81–89.
18. 7. Zvjagincev D.G. Biololgiya pochv / D.G. Zvjagincev, I.P. Bab'eva, G.M. Zenova // M.: Izd-vo MGU, 2005. 445 p.
19. 8. Kononova S.V. Fosfonaty i ih degradacija mikroorganizma-mi / S.V. Kononova, M.A. Nesmejanova // Biohimija. 2002, T. 67, Vyp. 2, no. 6. pp. 220–233.
20. 9. Kuznecova E.M. Glifosat: povedenie v okruzhajushhej srede i urovni ostatkov / E. M. Kuznecova, V.D. Chmil' // Sovremennye problemy toksikologii. 2010, no. 1. pp. 87–95.
21. 10. Klisenko M.A. Metody opredelenija mikrokolichestv pesti-cidov v produktah pitanija, kormah i vneshnej srede. Spravochnik v 2 t // M.A. Klisenko, A.A. Kalinina, G.A. Hol'kova // M.: Kolos, 1992. T 1. 567 p.
22. 11. LAHEMA, Brno, Cheshskaja Respublika: diagnostics@lachema.cz, http://www.lachema.cz.
23. 12. Pesticide Fact Handbook: US EPA. Noyes Data Corporation. Park Ridge, New Jersey, 1990. Vol. 2. pp. 301–312.
24. 13. Evans, C.G.T. Methods in Microbiology // C.G.T. Evans, D. Herbert, D. Tempest // 1970. pp. 277–327.

References

Рецензенты:

Кузнецов С.М., д.м.н., начальник лаборатории промышленных микроорганизмов, ЗАО «Маркетинг-Бюро», г. Киров;
 Погорельский И.П., д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник НИЦ ФГКУ «48 ЦНИИИ» Минобороны России, г. Киров.
 Работа поступила в редакцию 28.07.2014.