



Występowanie i znaczenie elementów infekcyjnych w komórkach drożdży wykorzystywanych w procesach fermentacyjnych

Monika Dzwonek, Małgorzata Gniewosz, Marek Primik,
Wanda Duszkiewicz-Reinhard

Zakład Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Katedra Biotechnologii,
Mikrobiologii i Oceny Żywności, Wydział Technologii Żywności,
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, Warszawa

Presence and significance of the infectious elements in technologically relevant yeasts' cells

Summary

The killer phenotype of *Saccharomyces cerevisiae* strains is based upon the presence of viruses in the cytoplasm of the yeast cells. Recent analysis of the molecular basis in these phenomenon let researchers to reveal its molecular mechanism and ecological function.

Mammalian transmissible spongiform encephalopathies are likely due to the propagation of an abnormal form of some protein. Such infectious agents, which are termed prions, exist in yeasts.

This review highlights the variety of infectious elements present in *Saccharomyces cerevisiae* as well as their influence on the yeasts properties.

Key words:

viruses, prions, retroviruses, proteins, killer toxin, yeasts, *Saccharomyces cerevisiae*.

1. Wstęp

Ze względu na wyjątkowy metabolizm drożdże odgrywają zasadniczą rolę w procesach fermentacyjnych. Podczas naturalnej fermentacji alkoholowej różne rodzaje drożdży mogą wpływać na jej przebieg. Wprowadzenie inokulum w postaci

Adres do korespondencji

Monika Dzwonek,
Zakład Biotechnologii
i Mikrobiologii Żywności,
Katedra Biotechnologii,
Mikrobiologii i Oceny
Żywności,
Wydział Technologii
Żywności,
Szkoła Główna
Gospodarstwa Wiejskiego,
ul. Nowoursynowska 159 c,
02-776 Warszawa.

drożdży „szlachetnych” do nastawów fermentacyjnych w dużym stopniu zmienia układ całego środowiska (1). W charakterystyce genetycznej drożdży przemysłowych wykazano, że są to szczepy poliploidalne zwłaszcza triploidalne, tetraploidalne lub aneuploidalne. Mają one niską wydajność sporulacji i niską przeżywalność askospor, istnieje też znaczne zróżnicowanie w tempie wzrostu wśród klonów spor. Wynika to z segregacji aneuploidalnego zestawu chromosomów oraz segregacji genów letalnych lub wpływających na upośledzenie efektywnego wzrostu (2,3). Kolonie otrzymane z pojedynczych askospor są często homotalliczne lub nie mają zdolności do koniugacji z komórkami szczepu o przeciwnym typie płciowym (2). Panuje powszechny pogląd, że poliploidy, dzięki zwielokrotnionemu materiałowi genetycznemu, są bardziej stabilne i mniej podatne na czynniki mutagenne i zmienność genetyczną niż haploidalne i diploidalne szczepy laboratoryjne. Stąd nieprzypadkowe jest, jak się wydaje, występowanie szczepów poliploidalnych w procesach przemysłowych, tj. w piwowarstwie, gorzelnictwie, winiarstwie i drożdżownictwie, gdzie szczepy selekcionowane są m.in. w kierunku stabilności właściwości technologicznych. Niektórzy autorzy (4) wskazują jednak na coś zupełnie przeciwnego, twierdząc, że tempo zmian genetycznych u szczepów drożdży wzrasta wraz z ploidalnością. Szczepy poliploidalne mogą nieść wiele mutacji recesywnych, które w obecności dzikich alleli dominujących nie wpływają na ich fenotyp. Mutacje te w heterozygotach rozmnażających się bezpłciowo mogą kumulować się z pokolenia na pokolenie, nawet gdy są letalne, inaczej niż u form haploidalnych bądź homozygotycznych, które szybko zostałyby wyeliminowane z populacji. Mimo dużego tempa zmian genetycznych poliploidy mogą mieć zatem bardzo stabilny fenotyp. Stabilność genetyczna w potocznym ujęciu jest raczej funkcją częstości wydarzeń segregacyjnych prowadzących do ekspresji zmutowanych genów niż samej częstości mutacji (5).

Właściwości technologiczne drożdży przemysłowych zależą nie tylko od ploidalności szczepów, ale także od licznych elementów cytoplazmatycznych mogących występować w ich komórkach, np. wirusów i prionów (6).

2. Wirusy drożdżowe

Wirusy ze względu na swoje właściwości są zdolne do infekowania praktycznie wszystkich organizmów, w tym również drożdży. W komórkach drożdży można stwierdzić obecność takich elementów wirusowych, jak retrowirusy, dsRNA, czy też ssRNA (7).

Materiał genetyczny wirusów zdolny jest czasami do integracji z genomem gospodarza. W komórkach drożdży *S. cerevisiae* wykryto około 30 takich elementów retrowirusowych Ty (transpozonów). Transpozony są integralną częścią genomu wskutek czego są powielane i przekazywane do komórek potomnych łącznie z DNA gospodarza (8,9). Zróżnicowanie chromosomów wywołane obecnością w nich ele-

mentów Ty jest uznane za jeden z mechanizmów adaptacyjnych drożdży, warunkujący ich przystosowanie m.in. do różnego rodzaju warunków stresowych takich jak: stres jonowy, temperaturowy, czy też pokarmowy. Wykazano, że transpozony wpływają na zdolności sporulacyjne, formowanie worków oraz żywotność samych spor (10). Wpływają również poprzez możliwość zmiany swojego położenia na procesy ewolucyjne, wywołując nowe fenotypy (9). Lokalizacja wymienionych elementów retrowirusowych jest cechą charakterystyczną dla danego szczepu drożdży. Mogą być zatem wykorzystywane do identyfikacji szczepów drożdżowych.

dsRNA może występować w komórce drożdży *S. cerevisiae* nawet w stu kopiach. Niektóre podjednostki dsRNA mogą występować w postaci jednoniciowej cząsteczki ssRNA. Funkcjonalna zależność pomiędzy tymi obydwoimi formami RNA nie jest do końca poznana, wiadomo jednak, że ilość ssRNA wzrasta w komórkach poddanych działaniu czynników stresogennych, takich jak warunki głodowe czy też szok termiczny. Poziom ssRNA może zatem dostarczać informacji czy na komórkę oddziałują czynniki stresogenne (9,11).

Cząsteczki dsRNA współpracujące z co najmniej trzydziestoma genami jądrowymi MAK lub SKI, determinują fenotyp killerowy u drożdży. Zjawisko to najwcześniej i najdokładniej zbadano u drożdży *S. cerevisiae*, później u innych rodzajów np. *Pichia*, *Candida*, *Kluyveromyces*, *Hansenula*, *Debaryomyces*, *Torulopsis* i *Cryptococcus* (12,13). U większości drożdży za fenotyp killerowy odpowiedzialne są elementy dsRNA. Opisano jedynie trzy gatunki, u których toksyna killerowa jest kodowana przez liniowe plazmidy dsDNA. Występują one u *Kluyveromyces lactis* (plazmid pGKL1 i pGKL2), *Pichia acaciae* (pPacl-1 i pPacl-2) i *Pichia inositovora* (pPin1-1 i pPin1-3) (6,14,15).

dsRNA występujący w komórkach drożdży *S. cerevisiae* zbudowany jest z dwóch podjednostek L-A-dsRNA i M-dsRNA, które upakowane są w białkowym kapsydie. L-A jest autonomicznie replikującym się wirusem z rodziny *Totiviridae*, występującym u grzybów i pasożytów. Jego genom wielkości 4,579 bp został dokładnie scharakteryzowany i zsekwencjonowany (16). Podjednostka ta koduje zarówno białkowy kapsyd wirusa (Gag), jak również RNA zależną polimerazę RNA (Pol). Obydwa te elementy tworzą wspólną jednostkę białkową (Gag-Pol) (17-19). M-dsRNA jest satelitą podjednostki L-A. Odpowiada on za produkcję toksyn różnego typu, np. u *S. cerevisiae* występują trzy typy toksyn: K_1 , K_2 i K_{28} , które są determinowane obecnością odpowiedniej cząsteczki: M_1 dsRNA, M_2 dsRNA i M_{28} dsRNA. Cząsteczki M-dsRNA odpowiedzialne są nie tylko za produkcję określonej toksyny, ale także za oporność na nią (19,20). Toksyny te różnią się aktywnością w zależności od pH i temperatury środowiska (20,21). Większość toksyn drożdżowych cechuje niska stabilność w temperaturach 30-35°C i pH powyżej 5,0 (22). Naturalne szczepy killerowe zostały wyizolowane z wielu fermentacyjnych środowisk, owoców i warzyw oraz zbiorników wodnych. Najpowszechniej występującą toksyną w fermentujących moszczach gronowych jest toksyna typu K_2 wytwarzana przez *S. cerevisiae* (23). Z ekologicznego punktu widzenia killerowość jest zjawiskiem antagonizmu pomię-

dzy szczepami występującymi w danym środowisku i współzawodniczeniu o substancje pokarmowe w celu jego zdominowania (12,16).

Obecność kilku różnych typów toksyn u jednego gatunku może być związana z dużym prawdopodobieństwem występowania mutacji w obrębie elementów wirusopodobnych w trakcie replikacji materiału genetycznego (24). Odkryto bezpośredni związek między zdolnościami powielania oraz utrzymywania elementów cytoplazmatycznych i mutacjami w regionach MAK lub SKI. Zmiany informacji zakodowanej na tych odcinkach DNA powodują utratę podjednostki M-dsRNA i kilkukrotne zredukowanie liczby kopii podjednostki L-A dsRNA, co warunkuje destabilizację fenotypu killerowego (8,25).

Toksyny K_1 , K_2 i K_{28} (wytwarzane przez różne szczepy *S. cerevisiae*) są białkami zbudowanymi z dwóch podjednostek polipeptydowych: α i β , połączonych mostkami disulfitowymi. Aktywacja toksyn K_1 i K_2 jest bardzo podobna i składa się z dwóch etapów. W pierwszym etapie podjednostka β przyłącza się do receptorów występujących w ścianie komórkowej szczepu wrażliwego, którymi są cząsteczki β -1,6-D-glukanu. Następnie podjednostka α oddziela się od podjednostki β i przemieszcza do błony cytoplazmatycznej, w której na skutek zaburzeń potencjału elektrycznego powoduje wytworzenie porów, przez które wyciekają kationy do środowiska zewnętrznego, co doprowadza w efekcie do śmierci komórki.

Fenotyp killerowy K_{28} różni się znacząco od fenotypu K_1 i K_2 , pomimo wykazywania podobieństw fizjologicznych z toksyną K_2 . Toksynę K_{28} cechuje wyższa stabilność, w szerszym zakresie pH środowiska. Receptorem dla tej toksyny jest α -1,3 mannoproteina obecna w ścianie komórkowej szczepu wrażliwego (6). Następnie podjednostka β przemieszcza się transportem pęcherzykowym powrotnym do siateczki śródplazmatycznej, do cytozolu, skąd przechodzi do cytoplazmy i następnie do jądra. Zablockowany zostaje wzrost drożdży w ich wczesnej fazie S cyklu życiowego (26). K_{28} blokuje syntezę DNA, co przyczynia się do zahamowania pączkowania drożdży i doprowadza do utraty żywotności komórek (20,21,27,28).

3. Priony drożdżowe

Zgodnie z obecnie przyjętym modelem infekcyjna natura prionów związana jest z występowaniem swoistego rodzaju białek. Białka te mogą występować w dwóch konformacyjnych odmianach: normalnej i zmienionej w formę prionową. Obecność zmienionej formy katalizuje dodatkowo powstawanie kolejnych czynników infekcyjnych. Zjawisko to prowadzi w rezultacie do nagromadzenia w komórkach agregatów amyloidów i wystąpienia objawów chorobowych (29,30). W komórkach ssaków normalna forma białka PrP^C wydzielanego na powierzchnię komórek, w cyklu chorobowym przechodzi w formę zmienioną – PrP^{SC}, stając się odporną na działanie proteiny, przyjmując formę priona i wywołując choroby neurodegeneratywne. Obydwie formy PrP^C i PrP^{SC} mają identyczną budowę chemiczną, różnią się jedynie

strukturą przestrzenną. Białko PrP^C w 40% występuje jako α -helisa, nie zawierając jednocześnie formy harmonijkowej β , podczas gdy PrP^{Sc} występuje w obydwu wariantach odpowiednio w 50 i 20%. Pojawienie się formy odpornej na działanie proteiny K powoduje nagromadzenie się w komórkach agregatów i katalizuje dodatkowo przemianę kolejnych cząsteczek normalnej formy PrP^C w formę zmienioną priona (31,32). Dodatkowo fenotyp związany z niesieniem przez komórkę prionów może pojawić się spontanicznie w zdrowych komórkach. Zjawisko to występuje jednakże z niewielką wydajnością na poziomie 10^{-7} - 10^{-6} (8,33).

Występowania prionów, jako czynników infekcyjnych zostało zaobserwowane nie tylko w komórkach ssaków. Odkryto je m.in. u drożdży *S. cerevisiae* oraz u grzybów z rodzaju *Podospora*, a ich obecność w komórkach, podobnie jak w komórkach ssaków, jest związana z agregacją glikoprotein, co sprawiło, że badania nad mechanizmami infekcyjności oraz zwalczania prionów mogą być prowadzone na komórkach drożdżowych, jako na swoistego rodzaju systemie modelowym. Uzyskane wyniki z powodzeniem mogą zostać przeniesione bezpośrednio na organizmy wyższe i wykorzystywane w pracach badawczych nad niszczącymi tkankę nerwową chorobami ssaków (31,32,34). Najszerzej zbadane i opisane zostały dwa priony drożdżowe: [URE3] odpowiadający prionowej formie białka Ure2p oraz [PSI+], odpowiadający prionowej formie białka Sup35p (35). Białko Ure2p składa się z dwóch domen, odpowiednio o właściwościach regulatorowych warunkujących agregację amyloidów. Cząsteczka ta związana jest z przemianami związków azotowych w komórce (36). Podobnie jak Ure2p, w skład Sup35p wchodzi dwie domeny. Jest on komórkowym faktorem kończącym procesy translacji, odpowiednikiem występującego w komórkach ssaków polipeptydu eRF3 (32,37).

Priony drożdżowe i ssace pomimo podobnych mechanizmów działania wykazują szereg różnic. W odróżnieniu od prionów występujących u ssaków, które są obecne zarówno na powierzchni komórek jak i w przestrzeniach międzykomórkowych, priony drożdży są czynnikami cytoplazmatycznymi, przekazywanymi w trakcie podziałów komórkowych, a ich przemiana konformacyjna, jak się wydaje, jest indukowana czynnikami fizycznymi takimi jak np. zmiany pH cytoplazmy (31). Występowanie zmienionych form białkowych u drożdży nie jest związane z pojawieniem się zaburzeń negatywnych w cyklu życiowym komórki. Wręcz przeciwnie, przypisuje się im szereg właściwości związanych z naturalnymi przemianami ewolucyjnymi i adaptacyjnymi szczepów (34).

Odkryto kilka kolejnych cząsteczek w komórkach drożdży, o niektórych cechach typowych dla prionów, jednakże nie spełniających wszystkich wymogów odkrytych już białek infekcyjnych. Przykładem takiej cząsteczki może być [KIL-d] element warunkujący pozyskiwanie przez komórki właściwości killerowych, dzięki wpływowi na ekspresję i propagację dsRNA wirusów (38,39).

4. Czynniki warunkujące eliminowanie elementów infekcyjnych z komórki

Longo i wsp. (40) prowadzili doświadczenia mające na celu wyeliminowanie z komórek elementów infekcyjnych. W tym celu stosowali oranż akrydyny, uzyskując zahamowanie syntezy podjednostki M-dsRNA u *S. cerevisiae*. Hodowle takich komórek charakteryzowały się znacznie szybszym przyrostem biomasy, co może być tłumaczone przeznaczeniem nakładów energetycznych zużywanych na syntezę toksyny do przeprowadzania innych procesów. Zaobserwowali również, że „wyleczone” komórki przeprowadzały fermentację ze znacznie lepszą wydajnością i wyższym uzyskiem etanolu. Innymi związkami chemicznymi warunkującymi gubienie elementów infekcyjnych mogą być, np. cykloheksimid, czy też chlorowodorek guanidyny (GuHCl), będący czynnikiem pozwalającym na usunięcie obydwu znanych form prionów drożdżowych. Również wpływ warunków środowiska odgrywa bardzo ważną rolę w stabilności wirusów i prionów. Podwyższona temperatura w wielu przypadkach ma zdolność ich eliminacji (32,35).

5. Znaczenie elementów infekcyjnych występujących w komórkach drożdży na przebieg procesów fermentacyjnych

Środowisko fermentacyjne może być modyfikowane na kilka sposobów. Między innymi przez zmianę składu podłoża, zmianę parametrów prowadzenia procesu lub też przez odpowiednie zmodyfikowanie szczepów przeprowadzających fermentację. Udoskonalone współczesne szczepy drożdży przemysłowych powinny oprócz dobrych właściwości fermentacyjnych same chronić własne środowisko przed zakażeniami wywołanymi przez bakterie, np. *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Lactobacillus* i *Pediococcus*, drożdże np. *Brettanomyces*, *Pichia* i *Zygosaccharomyces*, a także pleśnie np. *Aspergillus*, *Botrytis*, *Penicillium* i *Trichoderma* (41).

Istnieje szereg doniesień świadczących o dużych możliwościach ulepszenia szczepów przemysłowych zdolnych do samozabezpieczenia środowiska fermentacyjnego przez sekrecję antymikrobiologicznych enzymów, czy też peptydów, do których także można zaliczyć toksyny killerowe (42). W większości tych badań z dużym powodzeniem wykorzystywano technikę fuzji protoplastów (43-45). Korzystnie wypadły także próby określające, czy szczepy killerowe *Kluyveromyces lactis* byłyby zdolne do zabezpieczenia środowisk kiszonych w warunkach tlenowych. Wywołano w ten sposób zahamowanie odkwaszania kiszzonek i tym samym wtórnego ich zakażenia (46).

Właściwości killerowe mogą nie tylko służyć jako czynniki zabezpieczające, są również dobrym czynnikiem różnicującym niektóre szczepy, np. z rodzaju *Candida* (47-49).

Infekcyjne elementy białkowe oprócz wspomnianego już aspektu wykorzystywania ich w kreowaniu układów modelowych nad badaniem mechanizmów infekcyj-

nych, wykazują również wpływ na cechy technologiczne drożdży. W przeprowadzonych badaniach wykazano, że szczepy zawierające priony posiadają nieco zmieniony fenotyp względem komórek nie mających tych elementów infekcyjnych. True i Lindquist (50) badali wpływ różnych czynników na szczepy drożdży posiadających i nie mających prionów. Wykazano istotny wpływ obecności prionów w komórkach na tolerancję podwyższonej temperatury, zdolność wzrostu w podłożu zawierającym etanol, dodatek soli cezu i litu, czy też niektórych antybiotyków. Stwierdzono także negatywny wpływ na wzrost komórek posiadających priony, dodatku do podłoża hodowlanego 5 mM ZnCl₂. Zaobserwowano, że w wielu przypadkach sama morfologia kolonii była inna. Zjawisko to może być tłumaczone oddziaływaniem samych prionów na mechanizmy translacyjne zainfekowanych komórek, co przyczynia się do powstania w komórkach nowych białek, wpływających na fenotyp organizmu (34,51).

Literatura

1. Pretorius I.S., (2001), *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 66, 1-20.
2. Bilinski C. A., Casey G. P., (1989), *Yeast*, 5, 429-438.
3. Ulaszewski S., (1994), *Biotechnologia*, 24, 17-31.
4. Paquin C., Adams J., (1983), *Nature*, 302, 495-500.
5. Pretorius I. S., van der Westhuizen T. J., (1991), *S. Afr. J. Enol. Viticult.*, 12, 3-31.
6. Schmitt M. J., Breing F., (2002), *FEMS Microbiol. Rev.*, 26, 257-276.
7. Dequin S., (2001), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 56, 577-588.
8. Wickner R. B., (1996), *Annu. Rev. Genet.*, 30, 109-139.
9. Sherman F., (1998), *The Encyclopedia of Molecular Biology and Molecular Medicine*, 302-325.
10. Querol A., Belloch C., Fernandez-Espinar M. T., Barrio E., (2003), *Int. Microbiol.*, 6, 20-205.
11. Lopez V., Gil R., Carbonell J. V., Navarro A., (2002), *Yeast*, 19, 545-552.
12. Zagorc T., Maraz A., Cadez N., Jemec K. P., Peter G., Resnik M., Nemanic J., Raspor P., (2001), *Food Microbiol.*, 18, 441-451.
13. Bartunek M., Jelinek O., Vondrejs V., (2001), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 283, 526-530.
14. Klassner R., Meinhardt F., (2002), *Plasmid*, 48, 142-148.
15. Banerjee H., Verma M., (2000), *Plasmid*, 43, 181-183.
16. Icho T., (1989), *J. Biol. Chem.*, 263, 1467-1475.
17. Ribas J. C., Wickner R. B., (1998), *J. Biol. Chem.*, 273, 9306-9311.
18. Fujimura T., Wickner R. B., (1987), *J. Biol. Chem.*, 263, 454-460.
19. Icho T., Wickner R. B., (1989), *J. Biol. Chem.*, 264, 6716-6723.
20. Flegelova H., Novotna D., Vijtiskova K., Janderova B., (2001), *FEMS Yeast Res.*, 2, 73-79.
21. Santos A., Marquina D., Leal J. A., Peinado J. M., (2000), *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 1809-1815.
22. Weiler F., Schmitt M. J., (2003), *FEMS Yeast Res.*, 3, 69-76.
23. Magliani W., Conti S., Gerloni M., Bertolotti D., Polonelli L., (1997), *Clin. Microbiol. Rev.*, 10, 369-400.
24. Domingo E., Holland J. J., (1997), *Annu. Rev. Microbiol.*, 51, 151-178.
25. Mertens P., (2004), *Virus Res.*, 1001, 3-13.
26. Heintel T., Zagorc T., Schmitt M. J., (2001), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 56, 165-172.
27. Yamamoto T., Imai M., Tachibana K., Mayumi M., (1986), *FEBS Lett.*, 195, 253-257.
28. Frohloff F., Fichtner L., Jablonowski D., Breunig K. D., Schaffrath R., (2001), *EMBO J.*, 20, 1993-2003.
29. Hall D., Edskes H., (2004), *J. Mol. Biol.*, 336, 775-786.

30. Harris D. A., (2000), *Nutrition*, 16, 554-556.
31. Bousset L., Melki R., (2002), *Microbes and Infection*, 4, 461-469.
32. Saube S. J., (2003), *Trends Biotech.*, 21, 516-519.
33. Sapriel G., (2001), *Res. Microbiol.*, 152, 531-538.
34. Pal C., (2001), *Trends Genet.*, 17, 167-169.
35. Uptain S., Lindquist S., (2002), *Annu. Rev. Microbiol.*, 56, 703-741.
36. Zhu L., Kihara H., Kojima M., Zhou J. M., Perrett S., (2003), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 311, 525-532.
37. Koshimoto A., Hasegawa K., Suzuki H., Taguchi H., Namba K., Yoshida M., (2004), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 315, 739-745.
38. Malagnac F., Silar P., (2003), *Curr. Opin. Microbiol.*, 6, 641-645.
39. Herman K. E., Wickner R. B., (2000), *PNAS*, 97, 6625-6629.
40. Longo E., Cansado J., Sieiro C., Calo P., Velazquez J. B., Villa T. G., (1992), *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 8, 147-150.
41. Pretorius I. S., Bauer F. F., (2002), *Trends Biotechnol.*, 20, 426-432.
42. Kitamoto H. K., Hasebe A., Ohmomo S., Suto E. G., Muraki M., Iimura Y., (1999), *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 4697-4700.
43. Farris G. A., Satta T., (1992), *Biotechnol. Lett.*, 14, 219-222.
44. Kunicka A., Szopa J. S., (1998), *Biotechnologia*, 1, 165-177.
45. Gniewosz M., Raczyńska-Cabaj A., Duszkiewicz-Reinhard W., Stachura G., (1999), *Pol. J. Food Nutri. Sci.*, 49, 17-25.
46. Kitamoto H. K., Ohmomo S., (1993), *J. Dairy Sci.*, 76, 803-811.
47. Buzzini P., Martini A., (2001), *J. Clin. Microbiol.*, 39, 3362-3364.
48. Ciani M., Faticenti F., (2001), *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 3058-3063.
49. Loweles K. F., Sherman C. A., Payne J., McKenzie D., Archer D. B., Merry R. J., Gasson M. J., (2000), *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 1066-1076.
50. True H. L., Lindquist S. L., (2000), *Nature*, 407, 477-483.
51. Lachmann M., Jablonka E., (1996), *J. Theor. Biol.*, 181, 1-9.