

## 非誘導条件下で機能する塩素化エテン類分解菌の単離と解析

### Isolation and Characterization of Chlorinated Ethenes-degrading Bacterium under Non-inducing Condition

米塚 健太<sup>1</sup>, 笠井 大輔<sup>1\*</sup>, 福田 雅夫<sup>1†</sup>  
KENTA YONEZUKA<sup>1</sup>, DAISUKE KASAI<sup>1\*</sup> and MASAO FUKUDA<sup>1†</sup>

<sup>1</sup> 長岡技術科学大学生物機能工学専攻 〒940-2188 新潟県長岡市上富岡町 1603-1

<sup>†</sup> 現 中部大学応用生物学部応用生物化学科

\* TEL & FAX: 0258-47-9427

\* E-mail: dkasai1@vos.nagaokaut.ac.jp

<sup>1</sup> Department of Bioengineering, Nagaoka University of Technology, 1603-1 Kamitomioka, Nagaoka, Niigata 940-2188, Japan

<sup>†</sup> Current Address: Department of Biological Chemistry, Chubu University

キーワード: バイオレメディエーション, 塩素化エテン類, multilocus sequence analysis (MLSA), average nucleotide identity (ANI) 解析, 比較ゲノム解析

Key words: bioremediation, chlorinated ethenes, multilocus sequence analysis (MLSA), average nucleotide identity (ANI) analysis, comparative genome analysis

(原稿受付 2017年3月27日/原稿受理 2017年4月20日)

#### 1. はじめに

有機溶媒をはじめとする化学物質は、工業発展に欠かせない要素の1つである。しかしながら、これらの化学物質の大規模使用や環境中への漏出事象などによる環境汚染が問題となっている。今日の我が国においても、揮発性有機化合物 (VOC) や重金属類、農薬などによる汚染が報告されている。中でも VOC による土壌汚染件数の7割以上を占める塩素化エテン類 (塩素化エチレン類) は、揮発性が高く水に難溶性で汚染が拡散しやすい点から掘削除去や物理的封じ込めによる処理が困難である。従って、これらの浄化には曝気や吸引による物理的処理法や鉄触媒を利用した化学的処理法が採用されやすい。加えて、低濃度の汚染に対して効果的である点から、微生物の物質代謝能力を利用した生物的処理 (バイオレメディエーション) も注目されている。

塩素化エテン類分解菌としては、嫌気性細菌である *Dehalococcoides* 属細菌が最もよく知られており<sup>1)</sup>、米国では微生物製剤として浄化に使用されている。しかしながら、これらの嫌気性細菌による塩素化エテン類の分解速度は遅く、テトラクロロエテン (PCE) やトリクロロエテン (TCE) の分解中間産物として、毒性の高いシス-ジクロロエテン (cDCE) や塩化ビニルモノマー (VC) が蓄積し、これらによる二次汚染がしばしば問題となっている。一方で、好気性条件下では *Pseudomonas* 属、*Burkholderia* 属、*Methylosinus* 属細菌など、トルエンやフェノール、メタン分解菌が有している基質特異性の広い酸素添加酵素によって塩素化エテン類が迅速に分

解される<sup>2)</sup>。しかしながら、これらの酵素生産は上述した基質の添加による誘導を必要とするため、浄化菌として環境中で利用することは難しい。そこで現在、誘導基質を必要とせずに好気条件下で高い塩素化エテン類分解活性を有する微生物を探索するとともに、それらを浄化菌として利用するために必要な実験的知見の収集を行っている。本稿では、塩素化エテン類分解菌の探索と、取得した塩素化エテン類分解菌の解析により得た知見の一端を紹介する。

#### 2. 塩素化エテン類分解菌のスクリーニング

分解速度が速い好気性の塩素化エテン類分解菌を取得するために、全国の様々な箇所から採取した土壌を用いて集積培養を行った。本集積培養では、トルエンやフェノールなどの誘導基質を必要としない分解菌の取得を目的としているため、炭素源として塩素化エテン類のみ (PCE, TCE, cDCE, またはトランス-ジクロロエテン [tDCE]) を供給した。集積培養により取得した分解菌候補株の塩素化エテン類分解能は、ヘッドスペースガスクロマトグラフィー-水素炎イオン化検出器 (GC-FID) を用いて基質の減少を測定することで評価した。その結果、cDCE で集積した6株でcDCEの分解能が観察された (図1)。これらの反応系にはトルエンやフェノール等の誘導物質は添加していないため、取得した各株のcDCE分解系は誘導基質の添加なしで発現することが示唆された。

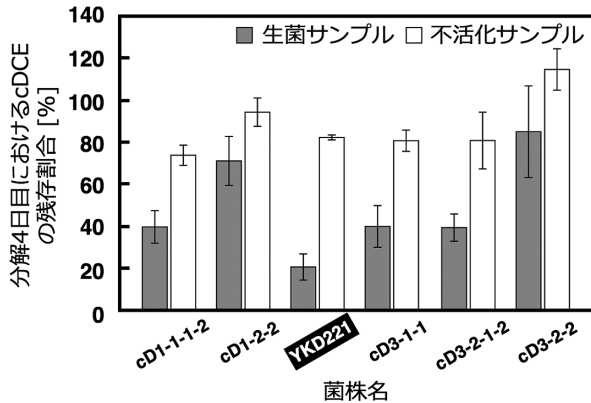


図1. cDCE分解菌として単離した6株のcDCE分解能

### 3. cDCE分解菌 YKD221株の解析

#### 3.1. 16S rRNA 遺伝子配列による分類同定

浄化菌として利用するためには、その分類学的情報が必須であるとともに、重篤な症状を引き起こす病原菌と同種ではないことを示す必要がある。そこで、取得した菌株の中で最も高いcDCE分解能を示したYKD221株に関して、16S rRNA 遺伝子配列による分類同定を行った。基準株のみを対象としてYKD221株の16S rRNA 遺伝子(1,429 bp)の相同性を検索した結果、*Pseudomonas* 属細菌の13種の基準株と98.5%以上の相同性を示した(表1)。一般に、16S rRNA 遺伝子配列が98.5%以上の相同性を示していれば、比較した株が互いに同種であると判定することができることから、YKD221株は*Pseudomonas* 属細菌であることが示された。基準株以外では、トルエン分解菌の*P. putida* F1株(100%)、有用宿主の*P. putida* KT2440株(99.86%)との配列相同性が最も高く、基準株で最も近縁な*P. plecoglossicida* NBRC 103162<sup>T</sup>株(99.79%)よりも高い相同性を示した。このことから、YKD221株は*P. putida* に分類される可能性が高いと考えられた。*P. putida* (group) 細菌の分類については、全ゲノム配列を利用した系統解析について項目4で詳しく述べる。

#### 3.2. 生育フェーズにおけるcDCE分解活性の差異

実際に浄化菌として利用する場合、分解活性の顕著な低下は深刻な問題となる。そこで、生育の各段階によるYKD221株のcDCE分解活性の違いを調べた。栄養培地での生育曲線をもとに、対数増殖期中期(2.5時間)および定常期(24時間)の菌体を用いてcDCE分解活性を比較した結果、対数増殖期中期の菌体は高いcDCE分解能を示したのに対し、定常期での分解能は著しく低いことが示された(図2A)。また、寒天培地で2日間培養した菌体のcDCE分解は、上述の両者のほぼ中間の値を示した。これらの結果から、YKD221株のcDCE分解は、菌体の生育フェーズによって大きく変化することが示唆された。これは、本株を浄化菌として使用する際に有益な情報になり得ると思われる。

#### 3.3. 塩素化エテン類に対する基質特異性

YKD221株がcDCE以外の塩素化エテン類に対しても分解能を有しているかを調べるために、PCE, TCE, tDCEの3種類の塩素化エテン類に対する分解活性を評価した。その結果、TCEに対しては弱い分解活性を示したものの、PCEおよびtDCEに対する分解活性は観察されなかった(図2B)。これらの結果とYKD221株がcDCEでの集積培養により取得された経緯から、本株はcDCE分解に特化した塩素化エテン分解菌であると考えられた。

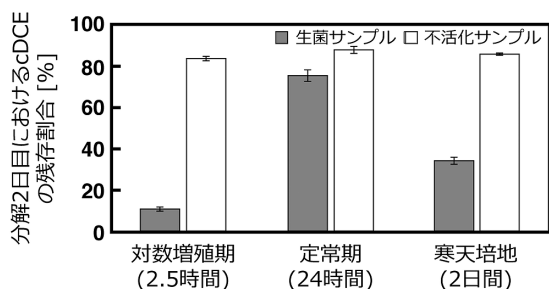
#### 3.4. cDCE分解産物の検出

既存の塩素化エテン類分解菌では、分解に伴って塩化物イオンが生成することが知られている。そこで、YKD221株のcDCE分解に伴う塩化物イオンの生成をイオンクロマトグラフィー分析により調べた。その結果、反応24時間後には179.1 molのcDCEの消失とともに、その約2倍にあたる347.3 molの塩化物イオンの生成が観察された(図2C)。このことから、YKD221株のcDCE分解において、1分子のcDCEに含まれる2つの塩素イオンの両方が放出されることが示唆された。

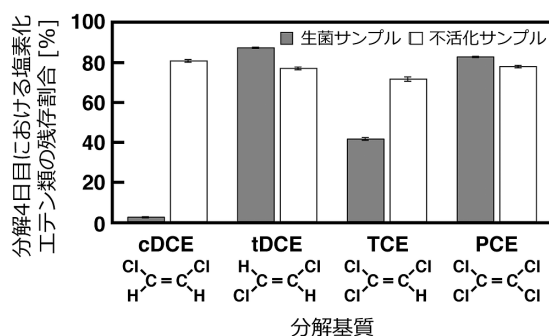
表1. 16S rRNA 遺伝子レベルでYKD221株と98.5%以上の配列相同性を示した基準株

種	菌株名	配列相同性 (一致/全塩基数)	アクセッション番号
1	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i> NBRC 103162 <sup>T</sup>	99.79% (1445/1448)	NR_114226.1
2	<i>Pseudomonas monteilii</i> CIP 104883 <sup>T</sup>	99.65% (1440/1445)	NR_024910.1
3	<i>Pseudomonas taiwanensis</i> BCRC 17751 <sup>T</sup>	99.65% (1438/1443)	NR_116172.1
4	<i>Pseudomonas entomophila</i> L48 <sup>T</sup>	99.59% (1442/1448)	NR_102854.1
5	<i>Pseudomonas putida</i> ICMP 2758 <sup>T</sup>	99.48% (1342/1349)	NR_114794.1
6	<i>Pseudomonas mosselii</i> CFML 90-83 <sup>T</sup>	99.31% (1435/1445)	NR_024924.1
7	<i>Pseudomonas parafulva</i> AJ 2129 <sup>T</sup>	99.17% (1436/1448)	NR_040859.1
8	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i> L-1 <sup>T</sup>	99.17% (1436/1448)	NR_025881.1
9	<i>Pseudomonas cremoricolorata</i> NBRC 16634 <sup>T</sup>	99.03% (1434/1448)	NR_113855.1
10	<i>Pseudomonas soli</i> F-279,208 <sup>T</sup>	98.94% (1404/1419)	NR_134794.1
11	<i>Pseudomonas guariconensis</i> PCAVU11 <sup>T</sup>	98.76% (1433/1451)	NR_135703.1
12	<i>Pseudomonas flavescens</i> NBRC 103044 <sup>T</sup>	98.69% (1429/1448)	NR_114195.1
13	<i>Pseudomonas japonica</i> NBRC 103040 <sup>T</sup>	98.62% (1428/1448)	NR_114192.1

### A. 各生育フェーズでの cDCE 分解活性



### B. 塩素化エテン類分解基質特異性



### C. cDCE 分解量と塩化物イオンの量的関係

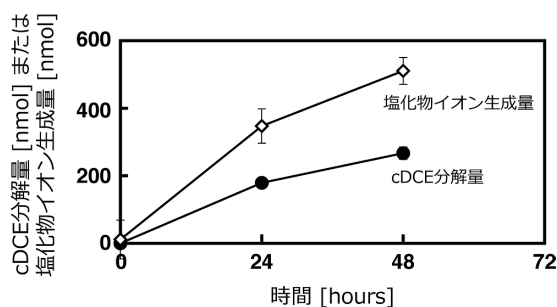


図2. YKD221株の塩素化エテン類分解能

### 3.5. 塩素化エテン分解へのトルエン分解系の関与

YKD221株と最も近縁なトルエン分解菌 *P. putida* F1株では、トルエンの初発分解反応を担うトルエンジオキシゲナーゼが TCE の分解に関与する<sup>3)</sup>。YKD221株のトルエン生育能を調べた結果、本株もトルエンを単一炭素源として旺盛に生育することが示された (図3A)。さらに、トルエンで生育した菌体を用いて cDCE および TCE 分解能を調査したところ、栄養培地で生育した菌体と比べて高い分解活性を示すことが明らかとなった (図3B)。特に cDCE の分解活性の向上は著しく、反応3時間で 500 nmol の cDCE をほぼ完全に分解した。このことから、YKD221株は、誘導なしでも cDCE を分解できるものの、トルエンによりその分解系が活性化されることが示唆された。

YKD221株の全ゲノム解析を行った結果、本株は F1株のトルエン分解酵素遺伝子群 (*tod* 遺伝子群) と同一の遺伝子群を持つことが明らかとなった。さらに、本遺伝子群に含まれるトルエンジオキシゲナーゼのオキシゲ

ナーゼ成分をコードする *todC1* を破壊したところ、トルエンでの生育能 (図3A) と cDCE および TCE の分解活性を完全に失った (図3C)。このことから、YKD221株の cDCE および TCE 分解においてもトルエンジオキシゲナーゼが関与することが示唆された。

### 3.6. YKD221株と F1株のゲノム比較

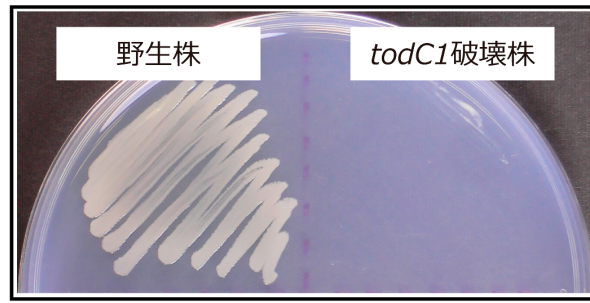
YKD221株と F1株のゲノムサイズは約 5.9 Mb、G+C 含量は 61.9% であり、ゲノム全体の相同性は 99.24% であった。両者のゲノム配列を比較した結果、YKD221株にのみ存在する遺伝子 (coding DNA sequence, CDS) は 96 個あることが示された。これらの中に塩素化エテン類の初発分解を担うと考えられる酸素添加酵素は認められなかったが、フェレドキシンやフェレドキシンレダクターゼなどの電子伝達コンポーネント、ギ酸レダクターゼやグルタチオン依存型のチオールレダクターゼなど下流分解に関与する酵素、複数の転写制御因子など、塩素化エテン類分解との関連が想像される CDS が含まれていた。YKD221株は F1株とは異なり、cDCE に特化した分解活性を示したことから、これらの遺伝子の存在が両株の活性の差異に関係しているかもしれない。さらに一塩基多型や挿入・欠失領域も複数見られたことから、YKD221株と F1株はゲノム配列レベルで相同性は高いものの、それらは同一ではないことが示された。

### 4. YKD221株の系統学的分類

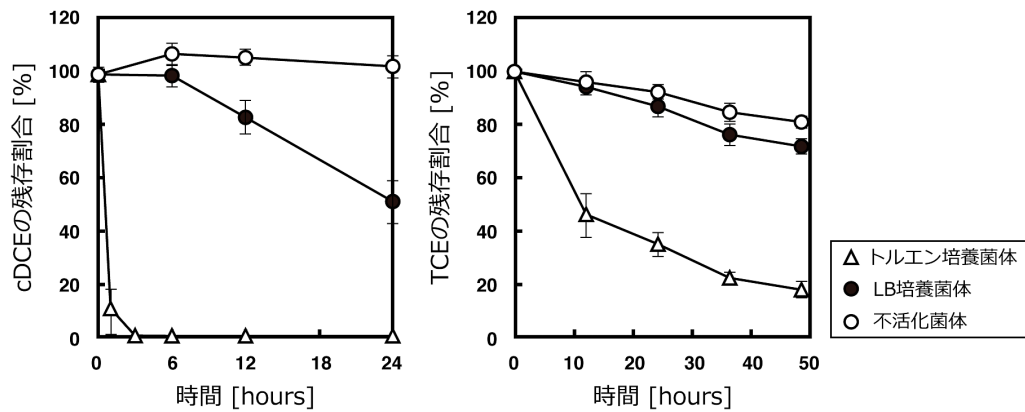
現在は 16S rRNA 遺伝子配列の相同性を利用した細菌の分類が主流であるが、3.1. で示したように YKD221株は 13 種の *Pseudomonas* 属細菌と同種となり、種レベルまで同定できなかった。*Pseudomonas* 属のように、同属内で配列相同性が極めて高いものは 16S rRNA 遺伝子配列では正確に分類できない。2000年代からのコンピュータの発展およびシーケンス技術の向上により、現在では細菌など比較的小規模の生物のゲノムシーケンスが容易に行えるようになった。これを受けて、ゲノム配列を利用した精緻な系統分類技術が誕生し、上記の問題が克服されつつある。中でも複数のハウスキーピング遺伝子配列を連結した配列を用いた multilocus sequence analysis (MLSA) や全ゲノム配列を用いた average nucleotide identity (ANI) は、細菌の分類解析法として数多くの研究者が利用し始めている。またこれらは、従来の種分類同定法である DNA-DNA ハイブリダイゼーション法との相関も明らかにされており、ANI では 95% が種分類の閾値となっている<sup>4,5)</sup>。

本研究においても、YKD221株を含めた合計 59 株の *P. putida* group 細菌を用いて、MLSA および ANI 解析を実施し、分解菌として取得した YKD221株の正確な分類を試みた。MLSA と ANI の解析結果は非常に高い相関性を示したため、本稿では ANI の結果を取り上げて説明する。ANI 解析結果をもとに作成した系統樹を図4に示した。また種分類の閾値である 95% を樹形内に図示し、互いに同種であると判定できた 9 つのクラスターを I~IX で番号付けした。解析の結果、59 株の *P. putida* group 細菌を 9 種類のクラスターを含む合計 26 種に分類することができた。YKD221株はクラスター I 内の他

## A. トルエン生育能



## B. トルエン培養菌体の cDCE および TCE 分解活性



## C. トルエン分解酵素遺伝子破壊株の cDCE および TCE 分解活性

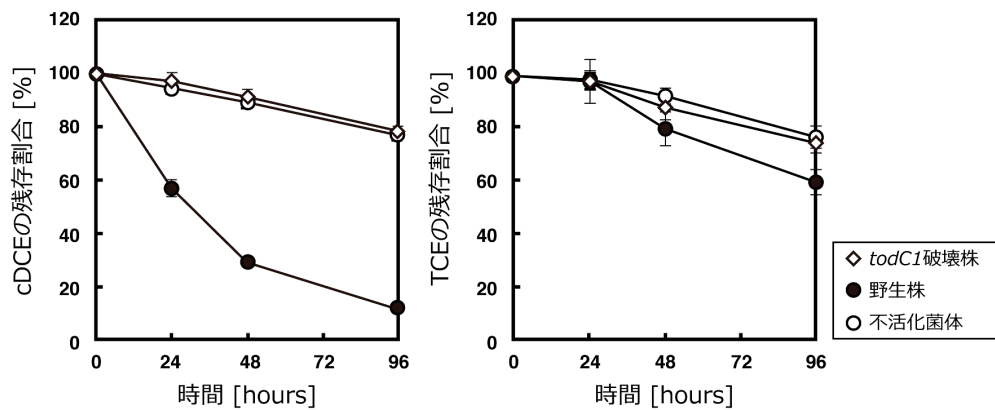


図3. YKD221 株の塩素化エテン類分解へのトルエン分解系の関与

の15株と同種であると判定できた。これらの中には、F1株やDOT-T1E株といったトルエン分解菌が含まれていた。また安全な宿主として利用されているKT2440株とも同種であったため、YKD221株も浄化菌として使用するために十分な安全性を有していると考えられた。一方で、*P. putida*の基準株であるNBRC 14164<sup>T</sup>株はクラスターI内ではなく、クラスターIIIに隣接する独立種として位置付けられた。そのため、*P. putida*の名を冠する他の株では、分類結果と種名が一致していない場合があり、*P. putida* groupでは、今後正確な分類に基づいた種名の変更が望まれる株も存在することが示された。

## 5. 比較ゲノム解析による臨床株との差別化

MLSA および ANI 解析では合計59株の*P. putida* group細菌を使用したが、これらの中には、病院などの医療現場から単離された26株の臨床株が含まれていた。臨床株は病原菌のような重篤な症状を引き起こすものではないため、現行では浄化菌として使用する際に問題にならないが、日和見感染性を持ち得ると考えられる。そこで、臨床株とYKD221株のような臨床現場以外の環境中から単離された株（非臨床株または環境株）に着目して、両者を差別化できないか検討した。

先に示したANI系統樹からも明らかなように（図4），

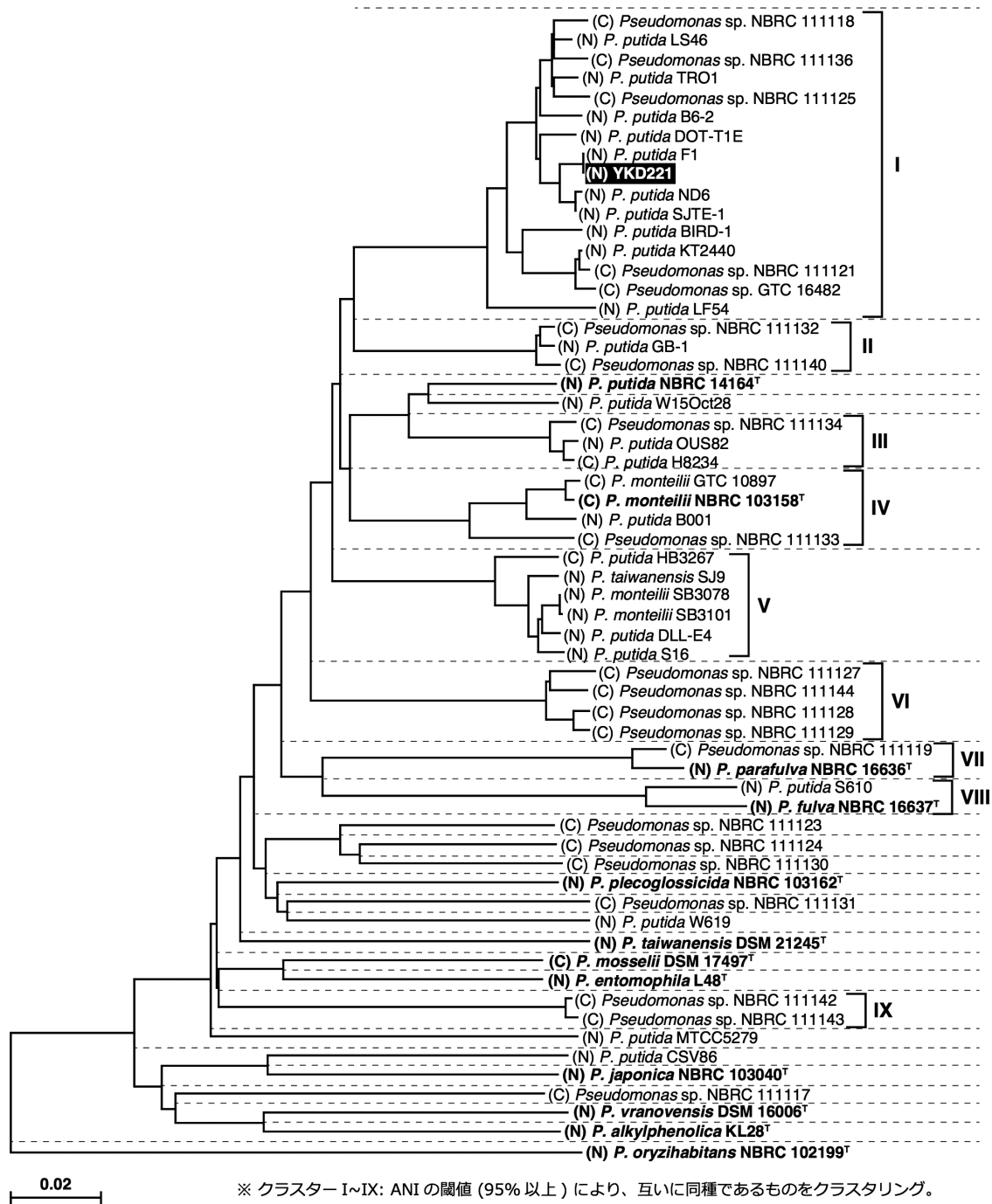


図 4. ANI 解析に基づいた YKD221 株の系統学的分類

*P. putida* group 細菌の臨床株および非臨床株は、一部で片方のみから構成されるクラスターがいくつか見られたが (クラスター VI, VIII, IX の全体, クラスター I, IV, V の一部分), 大部分は系統樹内に混在していた。そのため MLSA や ANI といった系統解析法では、塩基配列の類似度を比べているため、特定の異なる部分の違いが解析結果に大きく反映されないと考えられた。

臨床株および非臨床株の差異を見出すために、全ゲノム配列から取得した CDS をもとに比較ゲノム解析を実施した。CDS の分布およびその数をベン図として図 5 にまとめた。臨床株の全 CDS 数は 4,910 ~ 6,357 個の

間で、平均値は 5,527 個であった。一方、非臨床株の全 CDS 数は 4,108 ~ 6,153 個の間で、平均値は 5,297 個であった。全 CDS 数は最小値, 最大値, 平均値のいずれにおいても臨床株の方が非臨床株よりも僅かに多い傾向を示した。さらに、臨床株と非臨床株のそれぞれで普遍的に存在する CDS (コアゲノム CDS) を調べた。普遍性の判定は、アミノ酸配列の相同性が 20% 以上かつクエリカバー 60% 以上の CDS を基準とした。その結果、臨床株および非臨床株のコアゲノム CDS 数はそれぞれ 2,087 個および 1,847 個であった。またこれらのうち、1,332 個の CDS は臨床株、非臨床株問わず、解析に使

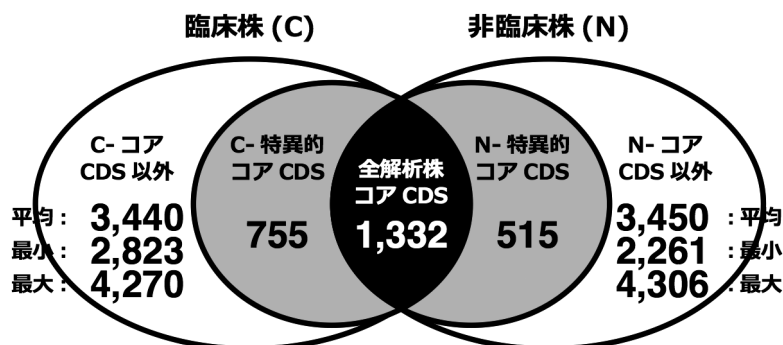


図 5. 臨床株および非臨床株の CDS 数の内訳

表 2. 臨床株および非臨床株特異的コアゲノム CDS の COG 機能別分類

COG major function	COG detailed function	コアゲノム CDS 数		割合 (C-N)/C
		臨床株特異的	非臨床株特異的	
Cellular processes and signaling	Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning	6	5	0.2
	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	30	23	0.2
	Cell motility	19	17	0.1
	Post-translational modification, protein turnover, and chaperones	19	23	-0.2
	Signal transduction mechanisms	38	26	0.3
	Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport	9	6	0.3
	Defense mechanisms	14	7	0.5
	Extracellular structures	2	0	1.0
	Nuclear structure	0	0	—
Information storage and processing	Cytoskeleton	0	0	—
	RNA processing and modification	0	0	—
	Chromatin structure and dynamics	0	0	—
	Translation, ribosomal structure and biogenesis	49	21	0.6
	Transcription	32	18	0.4
Metabolism	Replication, recombination and repair	25	16	0.4
	Energy production and conversion	40	34	0.2
	Amino acid transport and metabolism	61	60	0.0
	Nucleotide transport and metabolism	15	11	0.3
	Carbohydrate transport and metabolism	18	26	-0.4
	Coenzyme transport and metabolism	41	22	0.5
	Lipid transport and metabolism	18	19	-0.1
	Inorganic ion transport and metabolism	33	17	0.5
Poorly characterized	Secondary metabolites biosynthesis, transport, and catabolism	11	12	-0.1
	General function prediction only	42	36	0.1
	Function unknown	22	9	0.6
<b>Total</b>		<b>544</b>	<b>408</b>	<b>0.3</b>

用した全ての株で共通して見られた。これらのデータの差分から、臨床株および非臨床株で特異的なコアゲノム CDS 数は、それぞれ 755 個および 515 個であり、コアゲノム CDS 数も臨床株の方が 240 個多いという結果が得られた。これらの CDS 数の傾向は、臨床株では生体内で生存するためにより多くの機能性遺伝子を必要とすることに起因すると考えることもできるが、株毎の個体差が大きいことから今回の解析では各機能と関連付けることはできなかった。これは、インフルエンザ菌や緑膿菌、黄色ブドウ球菌などにおいて、ゲノムサイズや全 CDS 数と病原性の間に必ずしも相関があるわけではないことから明らかである<sup>67)</sup>。

臨床株および非臨床株で特異的なコアゲノム CDS の

うち、Clusters of Orthologous Groups (COG) による機能別分類が可能であったものを対象として、これらの内訳を表 2 にまとめた。臨床株特異的なコアゲノム CDS が多いもの (表 2, ratio 0.5 以上) は、細胞外因子 (Extracellular structures, 1.0), 翻訳・リボソーム因子・発生 (Translation, ribosomal structure and biogenesis, 0.6), 防御機構 (Defense mechanisms, 0.5), 補酵素輸送・代謝 (Coenzyme transport and metabolism, 0.5), 無機イオン輸送・代謝 (Inorganic ion transport and metabolism, 0.5) であった。これらの機能別分類とともに病原性に関わる因子を調べたところ、臨床株と非臨床株を識別するための指標となり得るいくつかの CDS を見出した。

(1) 細胞外因子に関わる CDS : IV 型線毛と II 型分泌

系が見出された。IV型線毛は感染時の定着に重要なバイオフィーム形成に関わる湿固相表面の移動能を提供する病原因子であり、II型分泌系はIV型線毛の形成に関与することが、*Pseudomonas aeruginosa* (緑膿菌)を含む細菌で報告されている<sup>8)</sup>。

(2) 防御機構に関わるCDS: チオールペルオキシダーゼおよびカタラーゼ(ヒドロキシペルオキシダーゼI, HPI)が含まれる。これらの酵素は生体内の異物殺菌作用に寄与する活性酸素種の1つである過酸化水素を無毒化する酵素として知られている<sup>9)</sup>。一方で、活性酸素種の1つであるスーパーオキシドアニオンの無毒化に関わるスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)<sup>10)</sup>は、臨床株だけでなく非臨床株にも存在していたことから、指標遺伝子としては適さないと考えられた。

(3) 無機イオン輸送・代謝に関わるCDS: シデロフォアレセプター(トランスポーター)が含まれる。生体内ではほとんどの鉄イオンが固定化され遊離の鉄イオンが欠乏しているため、鉄イオンを獲得するためにシデロフォアが感染に関与することが知られている<sup>11,12)</sup>。シデロフォアそのものは臨床株特異的ではないが、シデロフォアレセプター(トランスポーター)が臨床株のシデロフォア分泌量を増加させる役割を担っている可能性が考えられた。

(4) 抗生物質分解に関わるCDS:  $\beta$ -ラクタマーゼおよびペニシリンアミダーゼ(アシラーゼ)が含まれる。これらの酵素は、 $\beta$ -ラクタム系抗生物質を不活化し抗生物質耐性に関与する。特に $\beta$ -ラクタマーゼは、病原性菌に広く分布していることが知られている<sup>13,14)</sup>。

以上の中から、*P. putida* group細菌の臨床株および非臨床株を正確に区別できる指標となり得る遺伝子を特定し、それらを利用した分類法が確立できれば、両者を容易に判別することが可能になると期待される。

## 6. おわりに

これまでに、cDCE分解能を持つYKD221株の取得と、その塩素化エテン類分解能や分解遺伝子などバイオレメディエーションでの利用に有益な情報の収集が行われて

きた。また分解菌の比較ゲノム解析から、臨床株と非臨床株の区別に利用できる遺伝子の候補が限定され、微生物の安全性を評価するための指標確立に向けた基礎的知見が得られている。YKD221株は、公的菌株保存機関であるNITE Biological Resource Center (NBRC)に寄託されており、浄化事業者への分譲体制も整備されている。本研究によって得られた成果を利用すれば、浄化菌の利用申請が比較的容易になると考えられ、今後、YKD221株が浄化菌として利用されることでバイオレメディエーション普及の一助となることを期待したい。そして、臨床株と非臨床株を区別可能な遺伝子を用いた菌株の安全性評価基準が確立されることも期待される。

## 謝 辞

以上の研究成果は、経済産業省受託事業「土壌汚染対策のための技術開発」の研究助成によって得られたものである。ここに感謝の意を表する。

## 文 献

- 1) Sung, Y., et al. 2006. Appl. Environ. Microbiol. 72: 1980–1987.
- 2) Morono, Y., et al. 2004. Appl. Environ. Microbiol. 70: 2830–2835.
- 3) Wackett, L.P. and D.T. Gibson. 1988. Appl. Environ. Microbiol. 54: 1703–1708.
- 4) Goris, J., et al. 2007. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57: 81–91.
- 5) Richter, M. and R. Rosselló-Móra. 2009. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 106: 19126–19131.
- 6) Konstantinidis, K.T., et al. 2006. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 361: 1929–1940.
- 7) Stover, C.K., et al. 2000. Nature. 406: 959–964.
- 8) Cisneros, D.A., et al. 2012. Mol. Microbiol. 86: 805–818.
- 9) Horst, S.A., et al. 2010. J. Bacteriol. 192: 2929–2932.
- 10) Narasipura, S.D., et al. 2003. Mol. Microbiol. 47: 1681–1694.
- 11) Carpenter, C. and S.M. Payne. 2014. J. Inorg. Biochem. 133: 110–117.
- 12) Cendrowski, S., et al. 2004. Mol. Microbiol. 51: 407–417.
- 13) Cornaglia, G., et al. 2007. Int. J. Antimicrob. Agents. 29: 380–388.
- 14) Luzzaro, F., et al. 2004. Diagn. Microbiol. Infect Dis. 48: 131–135.