
**Sebastian Niestępski, Monika Harnisz, Ewa Korzeniewska,
Adriana Osńska, Przemysław Kacprzyk**

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

e-mails: sebastian.niestepski@uwm.edu.pl; monikah@uwm.edu.pl;
ewa.korzeniewska@uwm.edu.pl; adriana.osinska@uwm.edu.pl;
przemyslaw.kacprzyk@student.uwm.edu.pl

**RÓŻNICOWANIE ŚRODOWISKOWYCH BAKTERII
Z RODZAJU *AEROMONAS***

**DIFFERENTIATION OF ENVIRONMENTAL BACTERIA
OF *AEROMONAS***

DOI: 10.15611/pn.2016.461.14

Streszczenie: Bakterie z rodzaju *Aeromonas* stanowią naturalną mikrobiotę wód powierzchniowych oraz gleb. Niektóre gatunki mogą wywoływać choroby u ryb, gadów oraz ssaków, w tym u ludzi. Skuteczna identyfikacja tych bakterii ze stawów hodowlanych czy wody pitnej może istotnie ograniczyć występowanie wywoływanych przez nie schorzeń. Celem niniejszej pracy było porównanie metod służących do identyfikacji bakterii z rodzaju *Aeromonas* izolowanych ze środowiska. Materiałem badawczym były szczepy środowiskowych *Aeromonas* sp., wyizolowane z rzeki Łyny (w Olsztynie) oraz ścieków oczyszczonych. Różnicowanie prowadzono, analizując materiał genetyczny izolatów za pomocą metody ERIC PCR rozszerzonej o występowanie genów oporności na tetracykliny oraz sekwencjonowania genu 16S rDNA. Wyniki niniejszych badań wykazały, że skuteczniejszą metodą do identyfikacji środowiskowych bakterii z rodzaju *Aeromonas* jest technika oparta na sekwencjonowaniu genu 16S rDNA.

Słowa kluczowe: *Aeromonas*, ERIC PCR, gen 16S rDNA, różnicowanie.

Summary: *Aeromonas* spp. are natural microbiota of surface waters and soils. Some species can cause diseases of fish, reptiles and mammals, including humans. Effective identification of these bacteria isolated from ponds or drinking water can reduce the incidence of diseases caused by these bacteria. The aim of this study was to compare methods for identification of *Aeromonas* spp. *Aeromonas* spp. strains used in this study were isolated from the Lyna River (in Olsztyn) and treated wastewater (Olsztyn Municipal Wastewater Treatment Plant). The study was evaluated in two steps. In the first step the occurrence of repetitive ERIC sequences and tetracycline resistance genes was studied. In the second step the almost whole gene 16S rDNA was amplified and sequenced. DNA sequencing had higher discriminatory power and proved to be useful for the genetic analysis of *Aeromonas* spp. population, whereas of ERIC PCR to differentiate *Aeromonas* spp. was less.

Keywords: *Aeromonas*, ERIC PCR, 16S rDNA gene, differentiation.

1. Wstęp

Bakterie z rodzaju *Aeromonas* są Gram-ujemnymi, fakultatywnie beztlenowymi, ruchliwymi, nieprzetrwalnikującymi pałeczkami [World Health Organization 2004]. Mikroorganizmy te powszechnie występują w środowisku naturalnym. Stanowią autochtoniczną mikrobiotę wód powierzchniowych oraz gleb. Mają silne właściwości adhezyjne, zdolność do tworzenia biofilmu w sieci wodociągowej, dlatego izoluje się je również z wody pitnej [Kościńska 2010; Kręgiel, Rygała 2006, 2010].

Bakterie *Aeromonas* spp. wytwarzają różne czynniki wirulencji. Uznawane są za fakultatywne patogeny ryb, u których mogą wywoływać zakaźne zapalenie skóry (*erythrodermatitis*), a także gadów oraz niektórych ssaków, w tym także człowieka. Zagrożeniem dla zdrowia człowieka są przede wszystkim trzy gatunki, tj. *Aeromonas hydrophila*, *A. veronii* oraz *A. caviae* [Alavandi, Ananthan 2003].

Do identyfikacji bakterii należących do tego rodzaju można stosować różne metody, np. metodę opartą na hodowli na podłożu wybiórczo-różnicującym *Aeromonas* Ryan Agar i potwierdzające testy biochemiczne bądź też analizę sekwencji konserwatywnego genu 16S rDNA. Inną metodą różnicowania bakterii z rodzaju *Aeromonas* jest reakcja ERIC PCR (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus* PCR). Sekwencje ERIC są to miejsca o identycznym ułożeniu nukleotydów, powtórzone w różnych częściach genomu. Metoda ERIC pozwala na szybkie i tanie różnicowanie gatunków, a dodanie do ERIC kolejnych cech różnicujących powoduje możliwość określenia np. pochodzenia szczepu. W przypadku *Aeromonas* spp. takim uzupełnieniem badania może być analiza występowania genów oporności na tetracykliny ze względu na ich wysoką frekwencję w genomie tych bakterii. Szybka i skuteczna identyfikacja bakterii z rodzaju *Aeromonas* ze stawów hodowlanych czy wody pitnej oraz oznaczenie gatunkowe może być istotnym czynnikiem ograniczającym występowanie chorób wywoływanych przez te bakterie.

Celem niniejszej pracy było porównanie metod służących do identyfikacji bakterii z rodzaju *Aeromonas* izolowanych ze środowiska.

2. Materiały i metody

Materiał do badań stanowiły 23 szczepy *Aeromonas* sp., wyizolowane z próbek ścieków oczyszczonych z olsztyńskiej oczyszczalni ścieków „Łyna” (11 szczepów) oraz wody z rzeki Łyna w okolicach oczyszczalni ścieków (12 szczepów). Hodowla bakterii prowadzona była na podłożu Ryana, które inkubowano w warunkach tlenowych w temperaturze 30°C przez 24 godziny. Po inkubacji pobrane zostały ciemnozielone, nieprzezroczyste kolonie o ciemniejszych środkach, a ich przynależność rodzajowa została sprawdzona testami biochemicznymi API 20 NE. Następnie wyizolowano z nich materiał genetyczny, stosując metodę lizy termicznej na podstawie danych podanych przez Harnisz i in. [2015].

Różnicowanie badanych środowiskowych szczepów *Aeromonas* prowadzone było w dwóch etapach:

- amplifikacja miejsc repetytywnych ERIC oraz genów oporności na tetracykliny,
- amplifikacja oraz sekwencjonowanie genu 16S rDNA.

Uzyskane wyniki porównano ze sobą w celu wykazania skuteczniejszej metody identyfikacji badanych bakterii środowiskowych.

2.1. Amplifikacja miejsc repetytywnych ERIC oraz genów oporności na tetracykliny

Amplifikację miejsc repetytywnych ERIC (*enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence*) badanych bakterii środowiskowych przeprowadzono na podstawie danych podanych przez Versalovic i in. [1991]. W reakcji amplifikowano sekwencję znajdującą się między starterami ERIC 1R i ERIC2, których sekwencje przedstawiono w tab. 1.

Tabela 1. Startery zastosowane do analizy DNA badanych szczepów bakterii z rodzaju *Aeromonas*

Gen	Sekwencja startera	Temperatura przyłączenia [°C]	Długość produktu [pz*]
1	2	3	4
ERIC	ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC AAGTAAGTGA CTGGGGTGAGCG	52	–
<i>tet(A)</i>	GCTACATCCTGCTTGCCTTC GCATAGATCGCCGTGAAGAG	56	211
<i>tet(B)</i>	TCATTGCCGATACCACCTCAG CCAACCATCATGCTATTCCATCC	56	391
<i>tet(C)</i>	CTGCTCGCTTCGCTACTTG GCCTACAATCCATGCCAACC	56	897
<i>tet(D)</i>	TGTGCTGTGGATGTTGTATCTC CAGTGCCGTGCCAATCAG	56	844
<i>tet(E)</i>	ATGAACCGCACTGTGATGATG ACCGACCATTACGCCATCC	56	744
<i>tet(K)</i>	TCGATAGGAACAGCAGTA CAGCAGATCCTACTCCTT	55	169
<i>tet(L)</i>	TCGTTAGCGTGCTGTCATTC GTATCCCACCAATGTAGCCG	55	267
<i>tet(M)</i>	GTGGACAAAGGTACAACGAG CGGTAAGTTCGTCACACAC	55	406
<i>tet(O)</i>	AACTTAGGCATTCTGGCTCAC TCCCACTGTTCATATCGTCA	55	515
<i>tet(S)</i>	CATAGACAAGCCGTTGACC ATGTTTTTGG AACGCCAGAG	55	667

Tabela 1, cd.

1	2	3	4
<i>tet(A(P))</i>	CTTGGATTGCGGAAGAAGAG ATATGCCCAATTAACCACGC	55	676
<i>tet(Q)</i>	TTATACTTCCTCCGGCATCG ATCGGTTTCGAGAATGTCCAC	55	904
<i>tet(X)</i>	CAATAATTGGTGGTGGACCC TTCTTACCTTGGACATCCCG	55	468
14F 1492R	AGAGTTTGATCATGGCTCAG GGTACCTTGTACGACTT	55	~1500

*pz – par zasad

Źródło: [Francois i in. 1997; Gillan i in. 1998, McMurry i in. 1987; Nawaz i in. 2006; Ng i in. 2001; Nikolich i in. 1992; Scott, Rood 1989; Speer, Salyers 1988; Tenover i in. 1987; Warsa i in. 1996; Versalovic i in. 1991].

Ponadto izolaty poddano analizie występowania 14 genów oporności na tetracykliny: *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C)*, *tet(D)*, *tet(E)*, *tet(G)*, *tet(K)*, *tet(L)*, *tet(M)*, *tet(O)*, *tet(S)*, *tet(A(P))*, *tet(Q)* oraz *tet(X)*. Geny oporności na tetracykliny amplifikowano w 3 grupach metodą multipleksowej reakcji PCR. Warunki reakcji dobrano na podstawie danych literaturowych [Nawaz i in. 2006; Ng i in. 2001]. Sekwencje starterów użytych do amplifikacji genów oporności na tetracykliny umieszczono w tab. 1.

Po amplifikacji uzyskane produkty reakcji PCR zostały rozdzielone metodą elektroforezy w 1,5-procentowym żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny.

Pokrewieństwo genetyczne badanych bakterii było badane zgodnie z metodą Nei i Li [1979] za pomocą programu komputerowego DGGESat 1.0 (van Hanne, Holenderski Instytut Badań Ekologicznych, NIOO-KNAW). Próbkę zgrupowano metodą nieważonych średnich połączeń (UPGMA). Wiarygodność uzyskanych wyników sprawdzono przy użyciu metody bootstrap (1000 powtórzeń).

2.2. Amplifikacja oraz sekwencjonowanie genu 16S rDNA

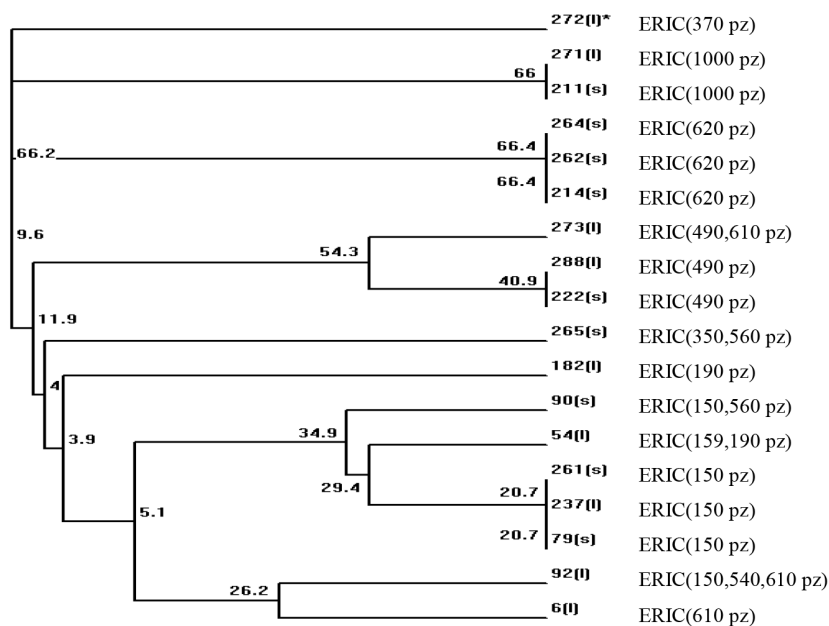
Warunki amplifikacji genu 16S rDNA badanych bakterii środowiskowych dobrano na podstawie wytycznych podanych przez Gillana i in. [1998]. W reakcji powielono niemal cały gen 16S rDNA (1492-1509 par zasad) z zastosowaniem uniwersalnych starterów 14F i 1492R (tab. 1). Po amplifikacji DNA zostało rozdzielone przez zastosowanie elektroforezy na 1,5-procentowym żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny. W przypadku uzyskania prawidłowego produktu amplifikacji genu 16S rDNA została ustalona jego dokładna sekwencja przy użyciu sekwencera Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer (Foster City, USA) oraz BigDye_Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems), zgodnie z instrukcją producenta. Sekwencjonowanie przeprowadzono bezpośrednio na oczyszczonym produkcie po amplifikacji. Reakcję PCR oraz sekwencjonowanie DNA wykonano z zastosowaniem tych samych starterów. Uzyskane sekwencje poddano funkcjonalnej analizie

z zastosowaniem narzędzia bioinformatycznego BLAST dostępnego na stronie internetowej National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Ponadto utworzono diagram pokrewieństwa genetycznego, stosując metodę UPGMA z zastosowaniem modelu p -distance. Do analizy wykorzystano program komputerowy MEGA 7.0.18 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets). Wiarygodność uzyskanych wyników sprawdzono metodą bootstrap (1000 powtórzeń).

3. Wyniki

3.1. Amplifikacja miejsc repetytywnych ERIC oraz genów oporności na tetracykliny

W ramach przeprowadzonej reakcji ERIC PCR uzyskano 11 produktów o różnych długościach (150, 190, 350, 370, 490, 540, 560, 590, 610, 620, 1000 par zasad), które zostały wykryte u 18 z 23 badanych szczepów. Z uzyskanych danych utworzono drzewo filogenetyczne z zastosowaniem programu DGGESat (rys. 1), na podstawie którego podzielono badane izolaty na 4 klastry, kolejno po 1, 2, 3 oraz 12 szczepów. Wszystkie grupy są ze sobą niepowiązane.

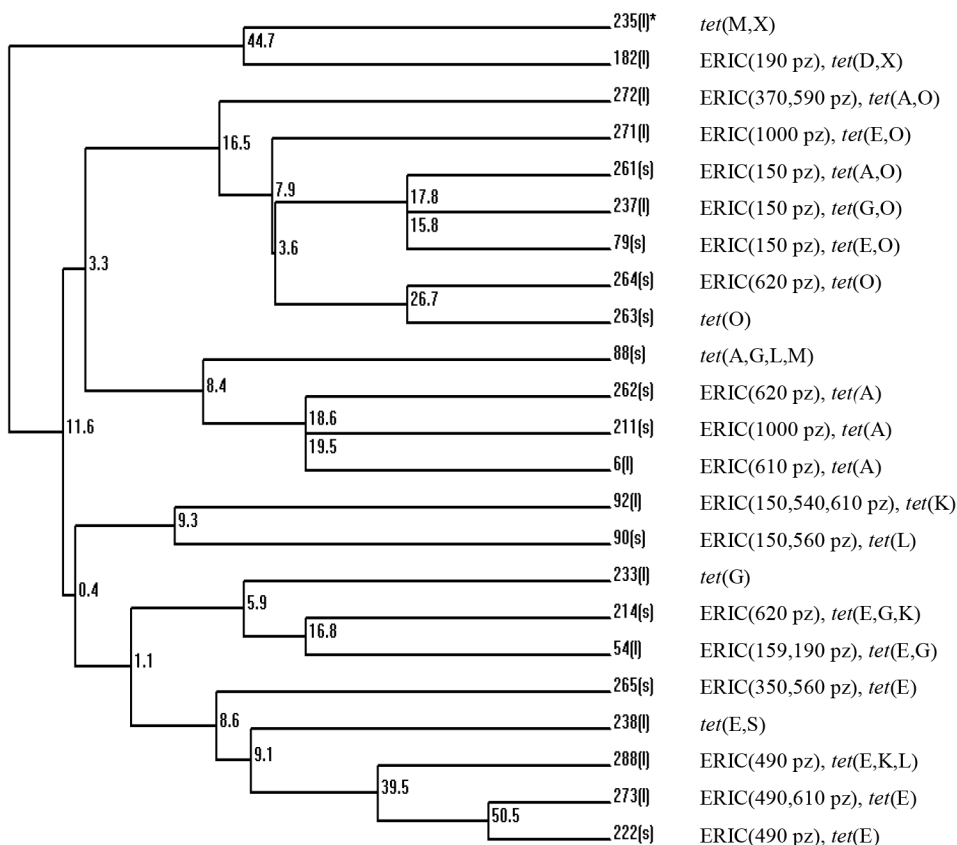


* numer szczepu oraz pochodzenie próbki: (l) – rzeka Łyna, (s) – ścieki oczyszczone; ERIC (X pz) – X – długości produktów reakcji ERIC PCR

Rys. 1. Dendrogram pokrewieństwa genetycznego 23 szczepów *Aeromonas* sp. Analiza ERIC-PCR wykonana metodą UPGMA z zastosowaniem współczynnika podobieństwa Dice, $p = 0,05$

Źródło: opracowanie własne.

W celu uzyskania większej liczby cech różnicujących do uzyskanych wyników ERIC PCR autorzy niniejszej publikacji dodali wyniki występowania 14 genów oporności na tetracykliny. Geny oporności na badany antybiotyk wykryto u wszystkich analizowanych szczepów bakterii środowiskowych, często po kilka w pojedynczym genomie. Z uzyskanych danych utworzono drzewo filogenetyczne z zastosowaniem programu DGGESat (rys. 2).



* numer szczepu oraz pochodzenie próbek: (I) – rzeka Łyna, (s) – ścieki oczyszczone; ERIC(X pz) – X – długości produktów reakcji ERIC PCR, tet – geny oporności na tetracykliny

Rys. 2. Dendrogram pokrewieństwa genetycznego 23 szczepów *Aeromonas* sp. Analiza ERIC-PCR oraz występowanie genów tet wykonana metodą UPGMA z zastosowaniem współczynnika podobieństwa Dice, $p = 0,05$

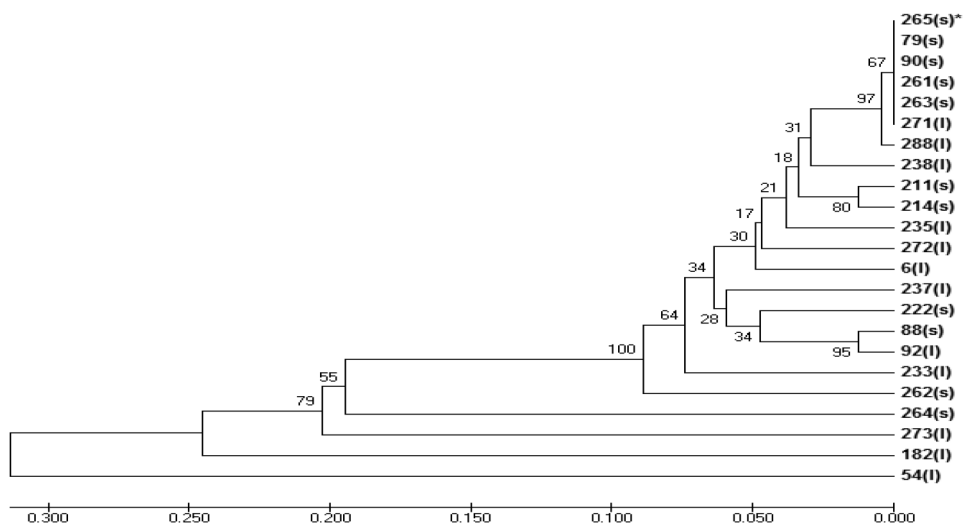
Źródło: opracowanie własne.

Analiza zbiorczego dendrogramu pozwoliła na pogrupowanie wszystkich 23 badanych szczepów do 3 klastrow podobieństwa genetycznego. Pierwszy klastrow zawierał dwa szczepy, oba pochodzące z rzeki Łyna. Kolejna grupa zawierała 11

szczepów, z czego 7 pochodziło ze ścieków oczyszczonych, a 4 z próbek wody rzecznej. Ostatni klaster uwzględniał 10 szczepów, z czego 6 pochodziło z próbek wody z rzeki, a pozostałe 4 ze ścieków oczyszczonych. Druga i trzecia grupa wykazują dalsze pokrewieństwo między sobą.

3.2. Sekwencjonowanie genu 16S rDNA

Gatunki z rodzaju *Aeromonas* wykazują bardzo wysoki poziom podobieństwa sekwencji nukleotydów genu 16S rDNA, od 1 do 32 różnic bazowych [Martinez-Murcia i in. 1992a; 1992b]. Niektóre gatunki wykazują znikome różnice, np. *A. caviae* i *A. trola* (jeden nukleotyd) oraz *A. media* i *A. hydrophila* (trzy nukleotydy). Dlatego po porównaniu uzyskanych sekwencji z bazami danych 21 badanych szczepów zostało przyporządkowanych jedynie do rodzaju *Aeromonas*, a tylko 2 szczepy oznaczono gatunkowo (szczep nr 235 – *A. media* oraz szczep nr 265 – *A. hydrophila*).



* numer szczepu oraz pochodzenie próbek: (l) – rzeka Łyna, (s) – ścieki oczyszczone

Rys. 3. Dendrogram pokrewieństwa genetycznego 23 szczepów *Aeromonas* sp. Analiza sekwencji nukleotydów genu 16S rDNA, wykonana metodą UPGMA z zastosowaniem modelu p -distance, $p = 0,05$

Źródło: opracowanie własne.

Uzyskane sekwencje poddano analizie pokrewieństwa za pomocą programu komputerowego MEGA 7.0.18, stosując metodę UPGMA z zastosowaniem modelu p -distance (rys. 3). Wszystkie badane szczepy wykazały wysokie podobieństwo sekwencji genu 16S rDNA. Wyodrębniono jeden klaster zawierający 19 szczepów, z którego 10 pochodziło ze ścieków oczyszczonych, a pozostałe 9 z próbek wody rzeki Łyna. Pozostałe 4 szczepy reprezentowały osobne grupy.

4. Dyskusja i wnioski

Istnieje wiele metod identyfikacji i różnicowania bakterii. Można je podzielić na zależne oraz niezależne od hodowli. Druga grupa zawiera przede wszystkim badania na poziomie molekularnym, które wykazują wyższą skuteczność różnicowania bakterii w porównaniu z metodami hodowlanymi [Adamus-Białek, Wawszczak 2014].

W niniejszej pracy zastosowano dwie metody różnicowania bakterii środowiskowych z rodzaju *Aeromonas*, a mianowicie analizę miejsc repetytywnych ERIC i obecności genów oporności na tetracykliny oraz funkcjonalną analizę sekwencji nukleotydu genu 16S rDNA. Uzyskane wyniki różniły się w zależności od zastosowanej metody.

Początkowo analiza ERIC PCR wykorzystywana była do różnicowania bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* oraz prątków [Sharples, Lloyd 1990; Hulton i in. 1991]. Z czasem za pomocą tej metody zaczęto oceniać stopień pokrewieństwa także innych grup bakterii. Davin-Regli i in. w 1998 roku wykazali, że metoda ERIC PCR może być z powodzeniem stosowana do różnicowania bakterii z rodzaju *Aeromonas*. Wyniki otrzymane w niniejszej pracy z zastosowaniem tej metody pozwoliły na utworzenie zbiorczego diagramu pokrewieństwa genetycznego z wykorzystaniem modelu UPGMA. Diagram ten podzielił wszystkie 23 badane bakterie na 3 klastry, zawierające kolejno 2, 11 oraz 10 szczepów. Pierwsza grupa obejmowała tylko szczepy pochodzące z rzeki Łyna, natomiast kolejne dwie grupy zawierały izolaty z obu środowisk (rzeki Łyna oraz ścieków oczyszczonych). Fakt ten może świadczyć o rozprzestrzenianiu się w środowisku naturalnych szczepów *Aeromonas* pochodzących ze ścieków. Otrzymane wyniki wskazują, że analiza występowania sekwencji ERIC u *Aeromonas* może pomóc w ustaleniu pochodzenia badanych izolatów. Podobne wnioski wysnuli Sechi i in. [2002], analizując występowanie sekwencji ERIC u 46 szczepów *Aeromonas* pochodzenia środowiskowego i klinicznego.

Wyniki sekwencjonowania 16S rDNA pozwoliły na określenie przynależności rodzajowej wszystkich badanych szczepów, aczkolwiek tylko dwa izolaty zostały sklasyfikowane do gatunku. Trudności te mogą wynikać z dużego podobieństwa genotypowego bakterii z rodzaju *Aeromonas* [Martinez-Murcia i in. 1992a; 1992b]. Niemniej uzyskane sekwencje umożliwiły utworzenie diagramu pokrewieństwa genetycznego badanych izolatów. W tym przypadku także zastosowano model UPGMA, by możliwe było porównanie obu zastosowanych metod różnicowania. Wyodrębniono jeden duży klastrowy zawierający 19 blisko spokrewnionych ze sobą szczepów, a każdy z pozostałych izolatów stanowił odrębny klastrowy, ze względu na mniejszy stopień podobieństwa uzyskanych sekwencji nukleotydu. Pierwsza grupa zawierała bakterie *Aeromonas hydrophila* i *A. meida*, u których sekwencja genu 16S rDNA różni się tylko trzema nukleotydami, co może świadczyć o tym, że prawdopodobnie pozostałe izolaty tej grupy także należą do tych gatunków. Nie zaobserwowano natomiast, by pochodzenie szczepów miało związek z pokrewieństwem genetycznym badanych izolatów.

Porównując wyniki obu metod, stwierdzono, że badania oparte na analizie sekwencji genu 16S rDNA są skuteczniejszą metodą różnicowania bakterii środowiskowych. Metoda ta dostarcza znacznie więcej informacji na temat badanych bakterii i umożliwia ich skuteczną identyfikację oraz grupowanie gatunkami. Niemniej jednak rozszerzona metoda ERIC może ułatwiać różnicowanie szczepów ze względu na pochodzenie.

Literatura

- Alavandi S.V., Ananthan S., 2003, *Biochemical characteristics, serogroups, and virulence factors of Aeromonas species isolated from cases of diarrhoea and domestic water samples in Chennai*, Indian Journal of Medical Microbiology, vol. 21, no 4, s. 233-238.
- Davin-Regli A., Bollet C., Chamorey E., Colonna D'Istria V., Cremieux A., 1998, *A cluster of cases of infections due to Aeromonas hydrophila revealed by combined RAPD and ERIC-PCR*, Journal of Medical Microbiology, vol. 47, s. 499-504.
- Francois B., Charles M., Courvalin P., 1997, *Conjugative transfer of tet(S) between strains of Enterococcus faecalis is associated with the exchange of chromosomal DNA*, Microbiology, vol. 143, s. 2145-2154.
- Gillan D., Speksnijder A., Zwart G., De Ridder C., 1998, *Genetic diversity of the biofilm covering Montacuta ferruginosa (Mollusca, bivalvia) as evaluated by denaturing gradient gel electrophoresis analysis and cloning of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA*, American Society for Microbiology, vol. 64, no 9, s. 3464-3472.
- Harnisz M., Korzeniewska E., Ciesielski S., Gołaś I., 2015, *fet genes as indicators of changes in the water environment: Relationships between culture-dependent and culture-independent approaches*, Science of the Total Environment, vol. 505, s. 704-711.
- Kozińska A., 2010, *Bakteryjne choroby ryb hodowlanych – aktualne problemy*, [w:] Szweđa W., Siwicki A.K., Terech-Majewska E., 2010, *Choroby ryb podlegające obowiązkowi zwalczania oraz inne choroby zagrażające hodowli – diagnostyka, profilaktyka, terapia*, IRS, Olsztyn, s. 113-137.
- Kręgiel D., Rygała A., 2006, *Ryzyko występowania w wodzie do picia bakterii z rodzajów Pseudomonas i Aeromonas*, Przemysł Spożywczy, vol. 60, no 4, s. 46-49.
- Kręgiel D., Rygała A., 2010, *Występowanie heterotroficznych bakterii z rodzaju Aeromonas w wybranym systemie dystrybucji wody*, Ochrona Środowiska, vol. 32, no 4, s. 47-50.
- Martinez-Murcia A.J., Esteve C., Garay E., Collins M. D., 1992b, *Aeromonas allosaccharophila sp. nov., a new mesophilic member of the genus Aeromonas*, FEMS Microbiol. Lett., vol. 91, s. 199-206.
- Martinez-Murcia A.J., Benlloch S., Collins M.D., 1992a, *Phylogenetic interrelationships of members of the genera Aeromonas and Plesiomonas as determined by 16S ribosomal DNA sequencing: lack of congruence with results of DNA-DNA hybridizations*, Int. J. Syst. Bacteriol, vol. 42, s. 412-421.
- McMurry L.M., Park B.H., Burdett V., Levy S.B., 1987, *Energy-dependent efflux mediated by class L (TetL) tetracycline resistance determinant from streptococci*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, vol. 31, s. 1641-1650.
- Nawaz M., Sung K., Khan S.A., Khan A.A., Steele R., 2006, *Biochemical and molecular characterization of tetracycline-resistant aeromonas veronii Isolates from Catfish*, Microbiology, vol. 72, s. 6461-6466.
- Nei M., Kumar S. (red.), 2000, *Molecular Evolution and Phylogenetics*, Oxford University Press, New York.

- Ng L.K., Martin I., Alfa M., Mulvey M., 2001, *Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes*, Mol. Cell Probe, vol. 15, no 4, s. 209-215.
- Nikolich M.P., Shoemaker N.B., Salyers, A.A., 1992, *A Bacteroides tetracycline resistance gene represents a new class of ribosome protection tetracycline resistance*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, vol. 36, s. 1005-1012.
- Scott P.T., Rood J.I., 1989, *Electroporation-mediated transformation of lysostaphin-treated Clostridium perfringens*, Gene, vol. 82, s. 327-333.
- Sechi L.A., Deriu A., Falchi M.P., Fadda G., Zanetti S., 2002, *Distribution of virulence genes in Aeromonas spp. isolated from Sardinian waters and from patients with diarrhea*, Journal of Applied Microbiology, vol. 92, s. 221-227.
- Sharples G.J., Lloyd R.G., 1990, *A novel repeated sequence located in the intergenic regions of bacterial chromosomes*, Nucleic Acids Res., vol. 8, s. 6503-6508.
- Sneath P.H.A., Sokal R.R. (red), 1973, *Numerical Taxonomy*, Freeman, San Francisco.
- Speer B.S., Salyers A.A., 1988, *Characterization of a novel tetracycline resistance that functions only in aerobically grown Escherichia coli*, Journal of Bacteriology, vol. 170, s. 1423-1429.
- Tenover F.C., Leblanc D.J., Elvrum P., 1987, *Characterization and expression of a cloned tetracycline resistance determinant from Campylobacter jejuni plasmid pUA466*, Journal of Bacteriology, vol. 169, s. 2984-2989.
- Warsa U.C., Nonoyama M., Ida T., Okamoto R., Okubo T., Shimauchi C., Kuga A., Inoue M., 1996, *Detection of tet(K) and tet(M) in staphylococcus aureus of Asian concountries by the polymerase chain reaction*, Journal of Antibiotics, vol. 49, s. 1127-1132.
- World Health Organization (WHO), 2004, *Guidelines for drinking water quality*, Addendum Microbiological Agents in Drinking-wate, Geneva.