



УДК 579.234

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ БАКТЕРИЙ ШТАММА *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* Sp7 И ЕГО СПОНТАННОГО МУТАНТА Sp7.K2

Е. Н. Сигида¹, Ю. П. Федоненко¹, О. Н. Смолькина¹,
С. А. Коннова^{1,2}, В. В. Игнатов^{1,2}



¹Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов

²Саратовский государственный университет

E-mail: E-mail: room308@ibppm.sgu.ru

Проведены сравнительные исследования липополисахаридов (ЛПС) азотфиксирующих ризобактерий штамма *Azospirillum brasilense* Sp7 и его спонтанного мутанта Sp7.K2, у которого в результате изменений плазмидного состава наблюдалось преобладание R-форм ЛПС. Выявлены различия в химическом составе и электрофоретическом профиле исследуемых препаратов ЛПС. Показано, что для получения ЛПС *A. brasilense* Sp7.K2 с целью проведения его дальнейших структурных исследований предпочтительнее использовать метод водно-фенольной экстракции, вместо рекомендованной для R-форм ЛПС экстракции смесью фенол–хлороформ–петролейный эфир.

Ключевые слова: *Azospirillum*, липополисахарид, выделение, структура.

Comparative Characterization of the Lipopolysaccharides of the Bacterium *Azospirillum brasilense* Sp7 and its Spontaneous Mutant Sp7.K2

E. N. Sigida, Yu. P. Fedonenko, O. N. Smol'kina,
S. A. Konnova, V. V. Ignatov

We performed comparative studies of lipopolysaccharides (LPSs) from dry biomass of the nitrogen-fixing rhizobacterium *Azospirillum brasilense* Sp7 and its spontaneous mutant Sp7.K2. In the mutant strain, R-LPS predominated, which was caused by plasmid rearrangement. Differences were revealed in the chemical composition and electrophoretic profiles of the LPS samples. It is shown that for the purpose of further structural studies of the LPS of *A. brasilense* Sp7.K2, water-phenol extraction is more preferable than phenol–chloroform–petroleum ether extraction, recommended for R-LPS.

Key words: *Azospirillum*, lipopolysaccharide, isolation, structure.

Грамотрицательные почвенные азотфиксирующие бактерии рода *Azospirillum* представляют собой модельный объект для изучения растительно-микробных ассоциаций [1, 2]. На протяжении последних лет для ряда штаммов азоспирилл были подробно исследованы многие аспекты растительно-бактериальных взаимодействий на молекулярном уровне, выяснена биологическая роль отдельных составляющих клеточной мембраны и капсулы, а также влияние биотических и абиотических факторов на формирование бактериального окружения растений [3–5]. Ресурсы и пластичность генома азоспирилл позволяют им приспосабливаться к изменяющимся условиям

окружающей среды. При этом у бактерий могут наблюдаться достаточно серьезные изменения фенотипических признаков и биологической активности. Возможность индукции подобных изменений в лабораторных условиях открывает широкие перспективы для изучения функций отдельных клеточных структур этих бактерий [6].

Известно, что в процессе присоединения азоспирилл к корням растений ведущую роль играют гликополимеры поверхности бактерий, к которым относятся капсульные полисахариды и липополисахариды (ЛПС) [7]. Гидрофобный участок молекулы ЛПС – липид А, интегрированный в наружный слой внешней мембраны, – имеет большое значение для целостности ее структуры. Липид А несет ответственность за проявление токсических и иммуномодулирующих свойств ЛПС. Углеводные компоненты ЛПС – коровый олигосахарид (кор) и О-специфический полисахарид (ОПС) – экспонированы на поверхности внешней мембраны грамотрицательных бактерий. Внешний участок кора состоит из гексоз, а внутренний – из гептоз и содержит 2-кето-3-дезоксиктоновую кислоту (КДО) – уникальный маркер молекулы ЛПС. Липид А вместе с внутренней частью кора является наиболее консервативной частью молекулы ЛПС. ОПС несет основные антигенные детерминанты и вследствие этого может являться фактором узнавания микроорганизма макропартнером [3].

Грамотрицательные бактерии, синтезирующие S-формы ЛПС (от англ. «smooth» – гладкий), в состав которых входят все три вышеперечисленных компонента, на плотных средах формируют гладкие колонии. В ЛПС бактерий, образующих шероховатые колонии, обычно отсутствует ОПС, и подобные ЛПС выделяют в R-формы (от англ. «rough» – шершавый). Также встречается переходная SR-форма ЛПС, ОПС которой состоит из одного повторяющегося олигосахаридного звена. Показано, что природные изоляты азоспирилл на плотных средах образуют шероховатые колонии с характерной R-морфологией [8], либо полиморфные колонии.



В рамках систематического изучения азоспириллы сделаны первые шаги в составлении хемотаксономической и серологической классификационных схем [4, 5]. Анализ данных этих исследований позволяет нам констатировать, что азоспириллы продуцируют преимущественно ЛПС *S*-формы. Это создает серьезную преграду на пути установления полной структуры ЛПС азоспириллы, ввиду того что они тяжело подвергаются деградации классическим методом мягкого кислотного гидролиза. Известно, что *R*-формы ЛПС чаще встречаются у мутантных штаммов бактерий. Недавно охарактеризован ЛПС спонтанного мутанта *A. brasilense* Sp245.5, у которого были выявлены существенные отличия в макромолекулярной организации и структуре ЛПС бактерий дикого типа *A. brasilense* Sp245 [9]. В данной работе мы представляем данные сравнительного анализа ЛПС бактерий типового штамма *A. brasilense* Sp7 и его спонтанного мутанта *A. brasilense* Sp7.K2 [10], в наружной мембране которого в результате изменений плазмидного состава наблюдалось накопление *R*-форм ЛПС.

Материалы и методы

В работе использовали бактерии типового штамма *A. brasilense* Sp7 и спонтанный мутант Sp7.K2, возникший в результате многократного замораживания и оттаивания культуры Sp7, охарактеризованный и любезно предоставленный нам сотрудниками лаборатории генетики микроорганизмов ИБФРМ РАН (г. Саратов). Культивирование бактерий исследуемых штаммов проводили на жидкой малатно-солевой среде с витаминами при 30°C до окончания экспоненциальной фазы роста [11]. Капсульный материал с поверхности клеток смывали 0.15 М NaCl, как описано в работе [4]. ЛПС экстрагировали из высушенных ацетоном бактериальных клеток *A. brasilense* Sp7 и Sp7.K2 горячим 45%-ным водным фенолом (ЛПС и ЛПС_{PCPW} соответственно), а из клеток *A. brasilense* Sp7.K2 ЛПС также экстрагировали смесью фенол-хлороформ-петролейный эфир (ЛПС_{PCPW}) [12, 13]. Очистку препаратов ЛПС проводили гель-фильтрацией на колонке (55 × 1.8 см, $V_0 = 30$ мл) с носителем Sepharose CL-4B («Pharmacia», Швеция). В качестве элюирующего раствора использовали 0.025М NH₄HCO₃ (рН 8.3).

Электрофорез препаратов ЛПС выполняли в 15%-ном Ds-Na-ПААГ [14]. Визуализацию компонентов осуществляли окрашиванием гелей красителем на основе азотнокислого серебра [15].

Исследование содержания в препаратах углеводов, белков, КДО выполнялось колориметрическими методами по известным методикам [11].

Деградацию ЛПС проводили 2%-ной CH₃CO₂H при 100°C в течение 2.5–4 ч до выпадения осадка. Образовавшиеся осадки отделяли центрифугированием (20 мин, 13000 об/мин). Водорастворимые фракции разделяли гель-хроматографией на колонке (46 × 1.6 см, $V_0 = 25$ мл) с носителем Sephadex G-50 в 0.05 М пиридин-ацетатном буфере (рН 4.1). Профили элюции строили, определяя во фракциях содержание углеводов по оптической плотности продуктов реакции элюента с фенолом и серной кислотой ($\lambda = 490$ нм) [16].

Анализ моносахаридного состава ОПС проводили тонкослойной хроматографией на пластинках с целлюлозой (толщина слоя 0.1 мм) как описано в работе [11], а также ГЖХ на хроматографе Hewlett-Packard 5890 после предварительного гидролиза образцов 2 М CF₃CO₂H (120°C, 2 ч), восстановления NaBH₄ и ацетилирования [17]. Деление выполняли на капиллярной колонке HP-5 в градиенте температуры от 160 до 290°C (7°C/мин). Идентификацию жирных кислот липида А в виде их метиловых эфиров [18] проводили с помощью ГЖХ на хроматографе GL-2010 (Shimadzu, Japan).

Результаты и их обсуждение

Из клеток типового штамма бактерий *A. brasilense* Sp7 и его спонтанного мутанта *A. brasilense* Sp7.K2 экстракцией ЭДТА с последующей обработкой экстрактов протеиназой К были получены ЛПС, электрофоретический анализ которых позволил выявить существенные межштаммовые различия в макромолекулярной организации О-антигенов. Если для ЛПС бактерий *A. brasilense* Sp7 было показано наличие молекул *S*- и *R*-форм примерно в равном соотношении, то в ЛПС штамма *A. brasilense* Sp7.K2 преобладала фракция молекул *R*-формы.

Методы выделения ЛПС *S*- и *R*-форм обычно различаются, поэтому в дальнейших исследованиях мы воспользовались двумя способами экстракции: горячей водно-фенольной смесью, по методу Вестфалля, и смесью фенола, хлороформа и петролейного эфира, по методу Галаноса, для биомассы *A. brasilense* Sp7 и Sp7.K2 соответственно. Выход ЛПС *A. brasilense* Sp7 составил 2.8% массы сухих клеток. Все попытки выделить ЛПС из высушенных ацетоном клеток *A. brasilense* Sp7.K2 по методу Галаноса с известными модификациями заканчивались неудачей. Однако двукратная обработка осадка клеток после экстракции по Галаносу водой при 67 °C позволила выделить препарат ЛПС_{PCPW} с выходом 5.7%. Исходя из этого можно предположить, что даже небольшое присутствие *S*-формы ЛПС в клеточной мембране *A. brasilense* Sp7.K2 существенно повышает гидрофильность



ЛПС и вследствие этого метод Галаноса оказывается неэффективным для их экстракции. Экстракция исходной биомассы *A. brasilense* Sp7.K2 по методу Вестфала позволила выделить ЛПС_{РW} с выходом 7.3%-ной массы сухих клеток.

Исследования показали, что элюиционные характеристики ЛПС_{РW} и ЛПС_{РСРW} *A. brasilense* Sp7.K2, полученные при аналитической гель-хроматографии на колонке с Sepharose CL-4B, отличались (рис. 1). Оба препарата представляли собой смесь молекул в достаточно большом диапазоне молекулярной массы. Но если в препарате ЛПС_{РW} наблюдалось равнозначное присутствие как высоко-, так и низкомолекулярной фракции, то для ЛПС_{РСРW} было характерно преобладание низкомолекулярной фракции.

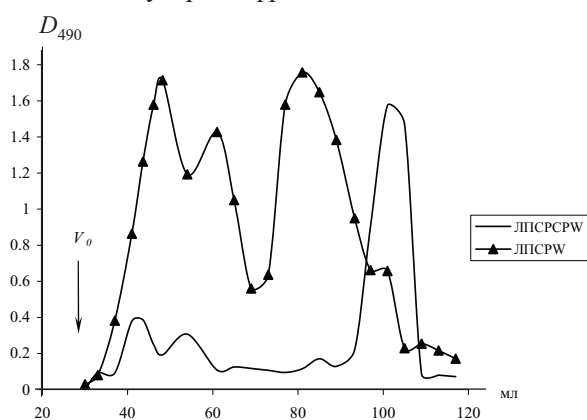


Рис. 1. Профили элюции ЛПС_{РW} и ЛПС_{РСРW} *A. brasilense* Sp7.K2 на колонке с Sepharose CL-4B

Все выделенные препараты ЛПС были подвергнуты электрофоретическому разделению в Ds-Na-ПААГ. Результаты электрофореза (рис. 2)



Рис. 2. Электрофорез ПААГ препаратов ЛПС *A. brasilense* Sp7(1), *A. brasilense* Sp7.K2 (2 – ЛПС_{РW}, 3 – ЛПС_{РСРW})

хорошо согласовывались с данными аналитической гель-фильтрации (см. выше). В электрофоретическом профиле ЛПС_{РСРW} присутствовали несколько индивидуальных зон окрашивания желтого и серого цветов, тогда как ЛПС_{РW} представлял собой шлейф, тянущийся от середины до конца трека, с градиентным изменением цвета от желто-оранжевого к коричневому и серому. Общее для профилей этих образцов ЛПС было наличие интенсивных полос окрашивания в середине и конце треков. Особенностью образца ЛПС_{РW} являлась наблюдаемая слабая полоса в верхней части трека, обусловленная присутствием молекул S-формы. В образце ЛПС_{РСРW} также были визуализированы две полосы, соответствующие молекулам S-формы, но с более короткой цепью ОПС. Учитывая тот факт, что концентрация образца ЛПС_{РСРW} в 2 раза превышала таковую для образцов ЛПС_{РW} и ЛПС, то интенсивность окрашивания полос и наличие шлейфа в образце ЛПС_{РW} указывали на то, что массовая доля углеводной части ЛПС_{РСРW} значительно меньше, чем в ЛПС_{РW}. Электрофоретический профиль *A. brasilense* Sp7 характеризовался наличием как S-, так и R-форм ЛПС, с выраженным преобладанием высокомолекулярной фракции. Таким образом, изменения плазмидного состава у бактерий *A. brasilense* Sp7.K2 привели к преобразованиям в макромолекулярной организации ЛПС.

Во всех исследуемых препаратах ЛПС были идентифицированы типичные для данных молекул компоненты: углеводы, жирные кислоты (в том числе и 3-гидроксиалкановые кислоты), КДО, гептоза, фосфор. Однако, как следует из представленных в табл. 1 данных, ЛПС_{РW} и ЛПС_{РСРW} *A. brasilense* Sp7.K2 отличаются друг от друга соотношением перечисленных выше компонентов. Отчасти это объясняется тем, что для экстракции ЛПС были использованы разные системы растворителей, следствием чего явилась различная степень микрогетерогенности полученных препаратов, проявляющаяся в длине полисахаридной части молекул и соотношении молекул разного размера. Однако различия в химическом составе ЛПС родительского и мутантного штаммов были более существенными. Для ЛПС *A. brasilense* Sp7 в составе его липидной части идентифицированы 3-гидрокситетрадекановая, гексадекановая, 3-гидроксигексадекановая и октадеценная кислоты (см. табл. 1). Причем на долю 3-гидроксиалкановых кислот приходилось около 70% всех идентифицированных в ЛПС *A. brasilense* Sp7 жирных кислот, а их содержание в препаратах ЛПС *A. brasilense* Sp7.K2 было существенно ниже и составляло примерно 30 и 45% для ЛПС_{РW} и ЛПС_{РСРW} соответственно. В то



Таблица 1

Химический состав препаратов ЛПС *A. brasilense* Sp7 (ЛПС) и *A. brasilense* Sp7.K2, выделенных разными методами (ЛПС_{РW} и ЛПС_{РСРW})

Компоненты		Препараты		
		ЛПС _{РW}	ЛПС _{РСРW}	ЛПС
Содержание, весовые % %, от веса МЭЖК*	Углеводы	12.0 ± 0.7	23.3 ± 1.2	21.9 ± 0.3
	Белки	2,3 ± 0.1	3,6 ± 0.1	0.6 ± 0.1
	КДО	0.9 ± 0.1	1.9 ± 0.1	0.6 ± 0.1
	Фосфор	3.2 ± 0.2	2.2 ± 0.3	2.5 ± 0.2
	3-ОН-C _{14:0}	14.4	23.0	40.9
	C _{16:0}	2.2	4.0	4.9
	3-ОН-C _{16:0}	15.1	21.5	30.3
	C _{18:1}	14.4	10.5	8.7
	C _{18:0}	7.4	9.0	—
	C _{19:0}	7.9	6.0	—
C _{20:1}	15.2	12.0	—	

же время в составе липидов А ЛПС_{РW} и ЛПС_{РСРW} были отмечены октадекановая, нонадекановая и 11-цис-эйкозеновая кислоты (суммарное содержание ~ 30%), отсутствующие в липиде А ЛПС родительского штамма (см. табл. 1).

Исследуемые ЛПС, ЛПС_{РW} и ЛПС_{РСРW} были подвергнуты мягкой кислотной деградации. В отличие от ЛПС родительского штамма, в обоих препаратах ЛПС штамма *A. brasilense* Sp7.K2 через 1.5–2 ч гидролиза при 100°C выпадал оформленный творожистый осадок (46 и 55% массы ЛПС_{РW} и ЛПС_{РСРW} соответственно). В случае ЛПС *A. brasilense* Sp7 даже увеличение времени гидролиза до 6 ч не приводило к подобному эффекту. После центрифугирования водорастворимая часть гидролизатов ЛПС, ЛПС_{РW} и ЛПС_{РСРW} была фракционирована гель-фильтрацией на колонке с Sephadex G-50 (рис. 3). На хроматограмме полисахаридной части ЛПС *A. brasilense* Sp7 отсутствовали пики, характерные для низкомолекулярных фракций олигосахаридов кора (данные не приведены), что свидетельствовало о высокой степени его замещенности О-полисахаридными цепями, а выход ОПС составил 39% массы ЛПС. Для ЛПС_{РW} выход ОПС составил 12%, а в препарате ЛПС_{РСРW} *A. brasilense* Sp7.K2 отсутствовала фракция высокомолекулярного полисахарида. Выход коровых олигосахаридов ЛПС_{РW} и ЛПС_{РСРW} *A. brasilense* Sp7.K2 составил 36 и 40% соответственно.

Результаты исследования моносахаридного состава углеводсодержащих компонентов ЛПС родительского и мутантного штаммов методом ГЖХ ацетатов полиолов приведены в табл. 2.

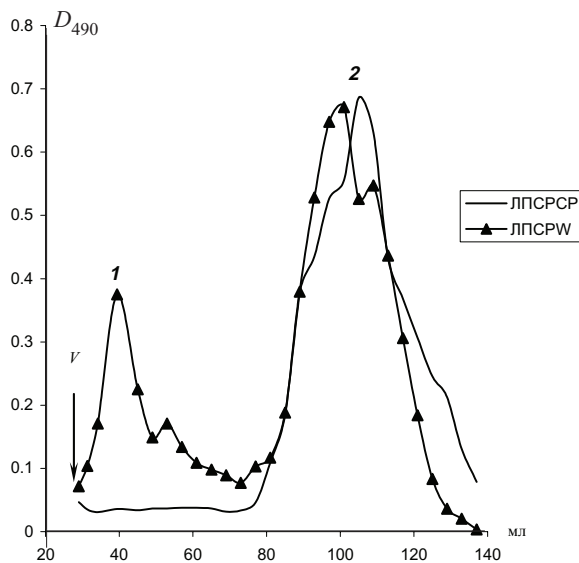


Рис. 3. Профили элюции водорастворимой части ЛПС_{РСРW} и ЛПС_{РW} после гидролиза 2 %-ной $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ на колонке с Sephadex G-50: 1 – фракция ОПС, 2 – фракция корового олигосахида

Таблица 2

Моносахаридный состав углеводных компонентов ЛПС *A. brasilense* Sp7 и *A. brasilense* Sp7.K2 (содержание, % от всех идентифицированных моносахаридов)

Препарат	Моносахариды						
	Rha	Fuc	Xyl	Glc	Gal	Man	GlcN
<i>A. brasilense</i> Sp7							
ОПС	27.2	24.5	5.4	5.2	21.7	—	16.0
<i>A. brasilense</i> Sp7.K2							
ОПС _{РW}	38.4	16.6	3.9	5.8	20.6	1.3	13.4
КОР _{РW}	43.5	14.8	2.8	8.9	16.2	1.4	12.4
КОР _{РСРW}	40.1	15.2	2.9	8.7	17.3	1.6	13.2

Примечание: «—» – компонент отсутствует.

В клетках родительского штамма в составе ЛПС продуцируется ОПС, в котором нейтральные моносахариды Rha, Fuc и Gal находятся приблизительно в равных процентных долях (27.2, 24.5, 21.5%, соответственно). Более низкое процентное содержание GlcN (16.0%) не является истинным и объясняется сниженной чувствительностью детектора ГЖХ в отношении аminosахаров. Введение поправочного коэффициента, вычисленного экспериментальным путем (определением отклика детектора хроматографа на внутренний стандарт), позволило установить реальное содержание GlcN в О-полисахариде и сделать вывод, что все перечисленные выше моносахаридные остатки находятся в соотношении ~ 1 : 1 : 1 : 1.

В составе образцов, полученных в ходе деградации ЛПС мутантного штамма, наблюдается значительное увеличение доли Rha (38.4 и 43.5%



в ОПС и коре, соответственно). Таким образом, в ОПС мутантного штамма содержание Rha по отношению к остальным доминирующим сахарам увеличилось в два раза, а в коровом олигосахариде – приблизительно в три раза. Возможно, это объясняется гетерогенностью углеводных компонентов, синтезируемых в составе липополисахарида *A. brasilense* Sp7.K2, один из которых представляет собой рамнан. Рамнаны являются полисахаридами азоспирилл, отнесенных к первой и третьей серогруппам [3, 19]. Полученные данные позволяют предположить, что у бактерий мутантного штамма при плазмидной перестройке на фоне продукции исходного ЛПС могла произойти индукция генов синтеза широко распространенного у азоспирилл рамнанового полисахарида в качестве О-антигена.

Таким образом, результат плазмидных перестроек, произошедших у спонтанного мутанта *A. brasilense* Sp7.K2, существенным образом сказался на структуре всех составляющих ЛПС, и в первую очередь затронул О-антиген, как наиболее вариативный участок молекулы.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 11-04-00533).

Список литературы

1. Steenhoudt O., Vanderleyden J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects // FEMS Microbiol. Rev. 2000. Vol. 24. P. 487–506.
2. Bashan Y., Holguin G., de-Bashan L.E. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural and environmental advances (1997–2003) // Can J. Microbiol. 2004. Vol. 50. P. 521–577.
3. Коннова О. Н., Бойко А. С., Бурьгин Г. Л., Федоненко Ю. П., Матора Л. Ю., Коннова С. А., Игнатов В. В. Химические и серологические исследования липополисахаридов бактерий рода *Azospirillum* // Микробиология. 2008. Т. 77, № 3. С. 350–357.
4. Филитъчева Ю. А., Беляков А. Е., Бурьгин Г. Л., Коннова С. А. Иммунохимическое исследование антигенных свойств почвенных ростстимулирующих бактерий рода *Azospirillum* // Изв. Саратов. ун-та. 2010. Т. 10. С. 62–65.
5. Кацы Е. И. Свойства и функции плазмид, ассоциированных с растениями бактерий рода *Azospirillum* // Успехи современ. биол. 2002. Т. 122, № 4. С. 353–364.
6. Newman M.-A., Dow J. M., Daniels M. J. Bacterial lipopolysaccharides and plant-pathogen interactions // Eur. J. Plant Pathol. 2001. Vol. 107. P. 95–102.
7. Коннова С. А., Федоненко Ю. П., Игнатов В. В. Структура и функции гликополимеров поверхности азоспирилл // Молекулярные основы взаимоотношений ассоциативных микроорганизмов с растениями / под ред В. В. Игнатова. М., 2005. С. 46–69.
8. Rodriguez Caceres E. A. Improved medium for isolation of *Azospirillum* spp // Appl. Environ. Microbiol. 1982. Vol. 44. P. 990–991.
9. Федоненко Ю. П., Кацы Е. И., Петрова Л. П., Бойко А. С., Здоровенко Э. Л., Качала В. В., Шаишков А. С., Книрель Ю. А. Структура О-полисахарида мутантного штамма азотфиксирующих бактерий *Azospirillum brasilense* Sp245 с измененным плазмидным составом // Биооргани. химия. 2010. Т. 36, № 2. С. 236–240.
10. Петрова Л. П., Борисов И. В., Кацы Е. И. Плазмидные перестройки у *Azospirillum brasilense* // Микробиология. 2005. Т. 74, № 4. С. 572–574.
11. Konnova S. A., Makarov O. E., Skvortsov I. M., Ignatov V. V. Isolation, fractionation and some properties of polysaccharides produced in a bound form by *Azospirillum brasilense* and their possible involvement in *Azospirillum*-wheat root interaction // FEMS Microbiol. Lett. 1994. Vol. 118. P. 93–99.
12. Westphal O., Jann K. Bacterial lipopolysaccharides. Extraction with phenol-water and further applications of the procedure // Meth. Carbohydr. Chem. 1965. Vol. 5. P. 83–91.
13. Galanos C., Luderitz O., Westphal O. A new method for the extraction of R lipopolysaccharides // Eur. J. Biochem. 1969. Vol. 9. P. 245–249.
14. Hitchcock P. J., Brown T. M. Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silver-stain polyacrylamide gels // J. Bacteriol. 1983. Vol. 154. P. 269–277.
15. Tsai C. M., Frasch C. E. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels // Anal. Biochem. 1982. Vol. 119. P. 115–119.
16. Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A., Smith F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances // Anal. Chem. 1956. Vol. 28. P. 350–356.
17. Sawardeker J. S., Sloneker J. H., Jeane A. A. Quantitative determination of monosaccharides as their alditol acetates by gas liquid chromatography // Anal. Chem. 1965. Vol. 37. P. 1602–1603.
18. Mayer H., Tharanathan R. N., Weckesser J. Analysis of lipopolysaccharides of gram negative bacteria // Methods Microbiology. L.: Academic Press, 1985. Vol. 18. P. 157–207.
19. Федоненко Ю. П., Бойко А. С., Здоровенко Э. Л., Коннова С. А., Шаишков А. С., Игнатов В. В., Книрель Ю. А. Структурные особенности О-специфических полисахаридов бактерий *Azospirillum* серогруппы III // Биохимия. 2011. Т. 76, № 7. С. 976–982.