



УДК 577.152.1: 579

## Особенности серного метаболизма и филогенетический анализ хроматограмм нуклеотидных последовательностей гена 16S rRNA у *Azospirillum thiophilum* sp. nov.

Лавриненко К.С., Гриднева Е.В., Логинова О.О., Сыров В.М., Грабович М.Ю.

*ГОУ ВПО «Воронежский государственный университет», Воронеж*

Черноусова Е.В.

*Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пуцино*

Поступила в редакцию 13.05.2009 г.

### Аннотация

Исследован серный метаболизм штамма BV-S<sup>T</sup>, выделенного из мата умеренно - термального сульфидного источника Северного Кавказа. Методом секвенирования амплифицированных фрагментов гена 16S rRNA с последующим анализом полученных хроматограмм показано, что штамм BV-S<sup>T</sup> близок филогенетически к представителям класса  $\alpha$  – *Proteobacteria* к роду азотфиксирующих микроорганизмов *Azospirillum*. Принимая во внимание морфологические особенности и уровень сходства гена 16S рPHK, штамм BV-S<sup>T</sup> был предложен в качестве нового вида рода *Azospirillum* - *Azospirillum thiophilum* sp. nov. Впервые показано, что представитель рода *Azospirillum* – *A. thiophilum* sp. nov. штамм BV-S<sup>T</sup> способен к литогетеротрофному росту в присутствии тиосульфата. Методом полимеразной цепной реакции с последующим электрофоретическим анализом ПЦР продукта обнаружен функциональный ген *nifH*, что указывает на способность *Azospirillum thiophilum* sp. nov. штамм BV-S<sup>T</sup> к азотфиксации.

**Ключевые слова:** *Azospirillum thiophilum* sp. nov., серный метаболизм, литогетеротрофный рост, филогенетический анализ, ген 16S rRNA, ген *nifH*.

The sulfur metabolism of a strain BV-S<sup>T</sup> isolated from a mat collected at an outflow of a moderately thermal sulfide spring of the Northern Caucasus was investigated. The sequencing of 16S rRNA gene with the following analysis of the received chromatograms has shown that the strain BV-S<sup>T</sup> is closely related to the genus of the associative *Azospirillum* bacteria. Take into consideration the morphological and physiological properties and a level of 16S rRNA gene similarity, the strain BV-S<sup>T</sup> was proposed as a new species *Azospirillum thiophilum* sp. nov. For the first time a member of the genus *Azospirillum* was shown to be capable of lithoheterotrophic growth with the reduced sulfur compounds. The oxidation of thiosulfate is connected with the respiratory chain functioning as shown by an inhibitor analysis. The PCR method with the following gel electrophoresis of PCR product has shown that *Azospirillum thiophilum* sp. nov. strain BV-S<sup>T</sup> is capable of nitrogen fixation.

**Key words:** *Azospirillum thiophilum* sp. nov., sulfur metabolism, lithoheterotrophic growth, phylogenetic analysis, gene 16S rRNA, gene *nifH*

### Введение

Бесцветные серобактерии являются гетерогенной группой и относятся к различным таксонам, но они обладают одним общим свойством - способны

вовлекать в метаболические процессы, восстановленные соединения серы и откладывать элементарную серу внутри клеток в их присутствии.

Группа бесцветных серобактерий с каждым годом пополняется новыми представителями, которые ранее считали типичными органогетеротрофными бактериями. Развитие в сероводородных биотопах гетеротрофных организмов может индуцировать у них способность к литотрофному росту, и в присутствии сульфидов откладывать элементарную серу внутри клеток. Ранее такой тип адаптации к сероводородным биотопам был обнаружен у *Leucothrix mucor*, *Sphaerotilus natans* [1]. В связи с этим, целью наших исследований была идентификация и изучение серного метаболизма у diaзотрофного штамма BV-S<sup>T</sup>, выделенного из серного мата, обнаруженного на выходе умеренно-термального сероводородного источника «Бесстыжие ванны», г. Пятигорск, Ставропольский край.

## Материалы и методы

Для выделения штамма BV-S<sup>T</sup> использовали полужидкую среду PSS следующего состава: (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 1,0 г/л, CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O – 0,03 г/л, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 1,0 г/л, тиосульфат натрия – 1г/л, сукцинат натрия – 1,0 г/л, пептон – 2,0 г/л, дистиллированная вода – 1л, набор витаминов и микроэлементов [2], агар – 1,7 г/л с добавлением суспензии FeS [3].

Определение S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>, S<sub>4</sub>O<sub>6</sub><sup>2-</sup> при их совместном присутствии в среде проводили методом раздельного иодометрического титрования [4].

Элементарную серу внутри клеток идентифицировали по характерному светопреломлению в проходящем поляризованном свете.

ДНК выделяли фенольным методом [5], в сочетании с процедурой замораживания-оттаивания биомассы [6]. Ген 16S рРНК амплифицировали с праймерами 27f и 1492g согласно протоколу [7]. Амплификацию фрагмента гена *nifH* проводили с использованием пары вырожденных праймеров F1- *nifH*-3r (табл.1) отработанных Федоровым и др [8]. Амплификацию проводили на приборе GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, USA).

Продукты амплификации подвергали электрофорезу в 1%-ном агарозном геле и окрашивали этидиум бромидом. В качестве электрофоретического буфера использовали 0.5x трис-боратный буфер (10x ТБЭ буфер: 0.89 М трис-НСl (108 г/л); 0.89 М борная кислота (55 г/л); 20 мМ ЭДТА (9.3 г/л)).

После электрофоретического разделения полосы ДНК визуализировали в проходящем ультрафиолетовом свете.

Определение нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК проводили с праймерами 27f, 1100g, 785f и 1492g на секвенаторе CEQ2000XL (Beckman Coulter, USA). Нуклеотидную последовательность гена *nifH* определяли с помощью праймера F1. Полученные хроматограммы анализировали с помощью программы Chromas 1.45. Отредактированные нуклеотидные последовательности фрагментов генов 16S рРНК и *nifH* были сравнены с последовательностями генов 16S рРНК и *nifH* из банка генов национального центра биологической информации с помощью программы BLAST (<http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST/>). Выравнивание нуклеотидных последовательностей и построение матрицы сходства проводили в программе CLUSTAL X.

Определение ферментативной активности проводили в супернатанте из двухсуточной культуры в середине фазы экспоненциального роста. Активность тиосульфатоксидоредуктазы (КФ 1.8.2.2) [9], сульфитоксидоредуктазы (КФ

1.8.3.1)[10] определяли спектрофотометрически в супернатанте по скорости восстановления  $K_3[Fe(CN)_6]$  и цитохрома *c* в присутствии окисляемого субстрата. Спектрофотометрические исследования с использованием  $K_3[Fe(CN)_6]$  и цитохрома *c* проводили при длине волны ( $\lambda$ ) 420 и 550 нм, соответственно.

Таблица 1. Праймеры, использованные в работе

Название праймера	5' - 3' последовательность	Специфичность
27 F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	ген 16S рРНК
1492 R	TACGGYTACCTTGTACGACTT	
785 F	GGMTTAGATACCTGGTAGTCC	
1100 R	GGGTTGCGCTCGTTG	
F	TAYGGIAARGGIGGIATIGGIAARTC	ген <i>nifH</i>
<i>nifH</i> -3r	TTGTTGGCIGCRTASAKIGCCATT	

*АФС-редуктазу* (КФ 1.8.99.2) определяли в реакционной среде того же состава, что и для сульфитоксидазы, но с добавлением аденозинмонофосфата (АМФ – 1 мкмоль/л) [11].

Активность *роданазы* (КФ 2.8.1.1) определяли по видоизмененной методике Sorbo [12] по образованию тиоционата, который определяли колориметрическим методом. Активность фермента учитывали в супернатанте по скорости образования тиоционата [13] колориметрическим методом на спектрофотометре СФ-26 при  $\lambda=460$  нм.

Скорость потребления кислорода при дыхании суспензии клеток определяли при помощи закрытого электрода Кларка и регистрировали на полярографе «Рекорд-4» (совместное производство Института биофизики РАН и СКБ, Пущино). Регистрацию полярограмм производили по общепринятой методике. Результаты рассчитывали по программе «Рекорд - 4» [14]. В опытах использовали клетки из фазы экспоненциального роста в среде, содержащей 0,2г лактата, 0,2г пептона и 1г тиосульфата в 1л; концентрация тиосульфата в ячейке составляла 12 ммоль/л. Скорость дыхания на тиосульфате определялась за вычетом эндогенного дыхания и химического окисления тиосульфата.

Для изучения особенностей функционирования ЭТЦ у исследуемых бактерий были использованы следующие ингибиторы (мкмоль/л): HQNO (ингибитор флавинохинон-цитохром *c* - участка) - 0,1; антимицин А (ингибитор цитохром в участка) – 0,5; ССССР (разобщители окислительного фосфорилирования) 0.06, ротенон (ингибитор NADH) – 50,0, KCN – 10,0.

## Результаты и их обсуждение

Штамм BV-S<sup>T</sup> был выделен из материала серного мата, обнаруженного на выходе умеренно-термального сульфидного источника «Бесстыжие ванны». Источник располагался в г. Пятигорске Ставропольского края и характеризовался слабой минерализацией (1.4-1.6 г/см<sup>2</sup>), температурой 28<sup>0</sup>С, слабощелочной рН среды (7.8), концентрацией S/S<sup>2-</sup> 1.5 – 2 мг·л<sup>-1</sup> и концентрацией кислорода – 2-2.5 мг/л. Пробу материала серного мата инокулировали в полужидкую PSS среду,

содержащую FeS. В микроаэробной зоне бактерии росли в виде пленки, расположенной на расстоянии около 3 – 5 мм от поверхности среды [15].

#### Анализ нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК

Молекулярно-генетический анализ выявил наличие 2 копий рибосомных генов 16S рРНК в геноме штамма BV-S<sup>T</sup>. На хроматограмме секвенированного фрагмента гена 16S рРНК в 21 позиции наблюдался двойной пик, соответствующий нуклеотидам Т и А (рис.1). Принято считать, что мультикопийность рибосомного оперона обуславливает метаболическую гибкость и как следствие эффективную адаптацию организма к условиям внешней среды. Недавние исследования по изучению почвенных бактерий показали, что количество рибосомных оперонов в геномах членов почвенного бактериального сообщества коррелирует со скоростью адаптации к изменению источников питания. После внесения в почву нового субстрата состав менялся таким образом, что среднее количество копий рибосомных оперонов в геноме у членов сообщества увеличивалось с 1-4 до 5-7. Вероятно, подобная реакция являлась экологической стратегией изменения состава природных бактериальных популяций в ответ на изменения условий питания [16, 18]. В частности, у *E.coli* для поддержания оптимального роста на сложных питательных средах требуется только 5 из 7 рибосомных оперонов, а все 7 оперонов необходимы для быстрой адаптации к новым источникам питания и температурным условиям [17, 18]. Так же, преимущественная однокопийность рибосомных оперонов архей объясняется приспособлением к существованию в узко специализированных экологических нишах [18].

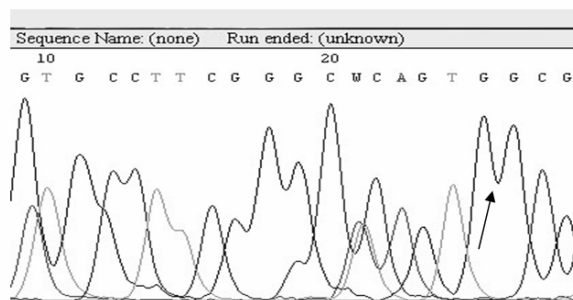


Рис.1 Хроматограмма секвенированного продукта полимеразной цепной реакции, полученного при амплификации гена 16S рРНК с помощью праймеров 27f и 1492r. Стрелкой отмечено присутствие двойного пика в 21 позиции, соответствующего нуклеотидам Т и А (W)

Была определена почти полная нуклеотидная последовательность гена 16S рРНК (около 1400 нк) у штамма BV-S<sup>T</sup>. Штамм BV-S<sup>T</sup> оказался близок филогенетически к роду ассоциативных азотфиксирующих микроорганизмов *Azospirillum* в пределах класса  $\alpha$  - *Proteobacteria* и имел 97,7% сходства с видом *Azospirillum doebereinae*. Принимая во внимание морфо-физиологические особенности (данные не представлены в статье) и уровень сходства гена 16S рРНК, штамм BV-S<sup>T</sup> был предложен в качестве нового вида рода *Azospirillum* - *Azospirillum thiophilum* sp. nov.

#### Фиксация молекулярного азота

Мы заметили, что штамм BV-S<sup>T</sup> способен к росту на среде, не содержащей источника азота. Для оценки способности штамма BV-S<sup>T</sup> к азотфиксации была проведена амплификация гена *nifH*, кодирующего Fe – белок нитрагеназы. Ген *nifH*

является маркером азотфиксации и на настоящий момент сформирована представительная база данных, содержащая последовательности *nifH* - генов бактерий из различных мест обитания [8].

Проведенный ПЦР-анализ ДНК с *nifH* ген-специфичными праймерами и последующий электрофорез продуктов реакции в 1% агарозном геле с этидиум бромидом показал наличие одной полосы на гель-электрофорезе размером 480 п.н. (рис.2). Поскольку при проведении ПЦР анализа нами использовались вырожденные праймеры, возникает необходимость достоверно убедиться, что полученный ПЦР-продукт является участком гена кодирующего Fe - белок Nif H нитрогеназы. Для этого полученный ПЦР-продукт секвенировали. Было установлено, что он имеет 96,8 % сходства с участком гена *nifH*, кодирующего Fe – белок NifH нитрогеназы *Azospirillum doebereinae*. Помимо этого данная последовательность ПЦР-продукта имела высокий процент сходства с последовательностями *nifH* - генов разных организмов. Это позволяет утверждать, что штамм BV-S<sup>T</sup> способен к азотфиксации.

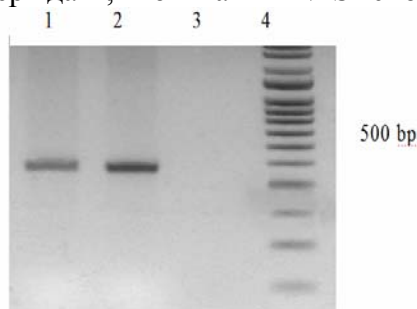


Рис. 2. Выявление функционального гена *nifH*, у *Azospirillum thiophilum* sp. nov. штамм BV-S<sup>T</sup>

Дорожка 1 – ПЦР с ДНК штамма BV-S; дорожка 2 – ПЦР с ДНК культуры, для которой ранее была отмечена способность к азотфиксации; дорожка 3 – контрольная ПЦР без ДНК – матрицы; дорожка 4 – маркер длины фрагментов ДНК

### Окисление серных соединений. Серный метаболизм

Показано, что *Azospirillum thiophilum* sp. nov. способен к окислению восстановленных соединений серы. В присутствии сульфидов может откладывать глобулы элементарной серы внутри клеток.

Основное внимание было сфокусировано на изучении роли восстановленных соединений серы в метаболизме выделенного штамма. Принимая во внимание низкое содержание кислорода в воде источника, в дальнейшей работе было определено влияние кислородного режима на процессы метаболизма тиосульфата у штамма BV-S<sup>T</sup>.

*A. thiophilum* sp. nov. штамм BV-S<sup>T</sup> не был способен к окислению тиосульфата в среде в отсутствие используемого органического субстрата. Его окисление в культуральной среде происходило только при одновременном внесении лактата (или сукцината). Анализ продуктов окисления тиосульфата показал, что штамм BV-S<sup>T</sup> практически полностью окисляет тиосульфат до тетраионата в эквимольном соотношении (рис. 3).

Окисление серных соединений в культуре *A. thiophilum* sp. nov. сопровождается увеличением урожая клеток в 1,2 раза (рис.4) и увеличению скорости роста и времени генерации.

Показано влияние кислородного режима культивирования на скорость окисления тиосульфата *A. thiophilum* sp. nov. В аэробных условиях роста скорость окисления составила 93 мг/л S/S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, а в микроаэробных - 250 мг/л S/S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (рис.3).

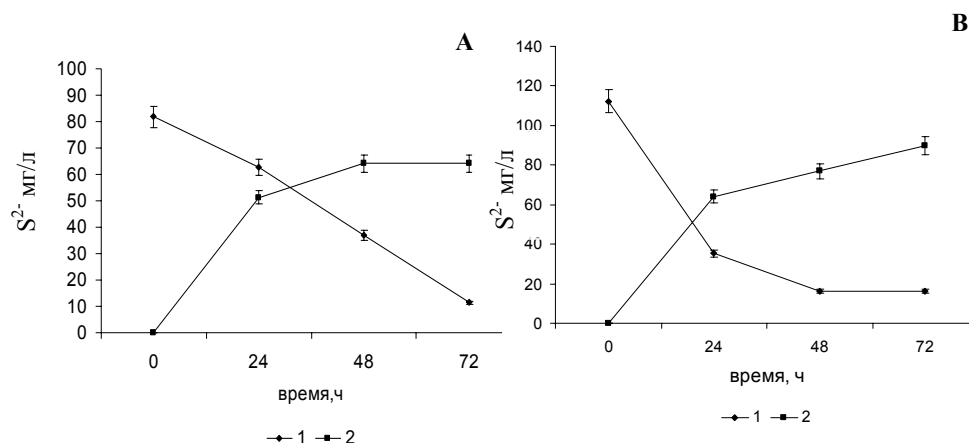


Рис. 3 Динамика окисления тиосульфата и накопление продуктов его окисления *A.thiophilum* sp. nov. штамм BV-S<sup>T</sup>. А - при 20 % содержании кислорода в газовой фазе, В – при 5 % содержании кислорода в газовой фазе; 1 – S/S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 2 – S/S<sub>4</sub>O<sub>6</sub>. Среда культивирования содержала 1 г/л тиосульфата натрия и 25 мг/л органических соединений лактата/ сукцината натрия

Учитывая высокую скорость окисления тиосульфата и наличие тетратионата в качестве конечного продукта можно предположить ферментативный характер окисления восстановленных серных соединений клетками штамма BV-S. У исследуемого штамма была определена активность ключевых ферментов диссимиляционного серного метаболизма. В аэробных условиях роста активность *тиосульфатоксидоредуктазы* составила 135,1 – 763,2 нмоль (мин · мг белка). Активности *сульфитоксидоредуктазы* и АФС–редуктазы не было обнаружено. У штамма BV-S<sup>T</sup> определена активность *роданазы* (80 нмоль (мин · мг белка)), которая участвует лишь в подготовительном серном метаболизме, расщепляя тиосульфат до сульфит - аниона и S<sup>0</sup>, и не связана с функционированием ЭТЦ.

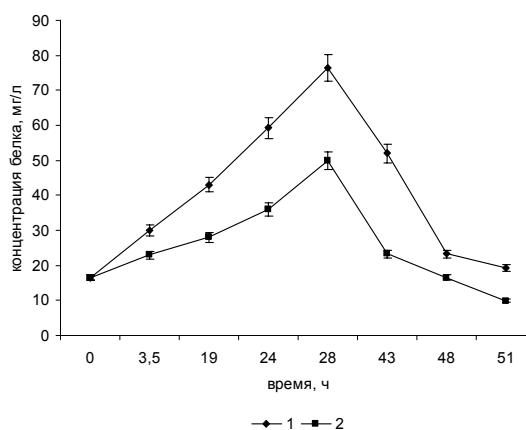


Рис.4 Влияние кислородного режима на рост *A. thiophilum* sp. nov. штамм BV-S<sup>T</sup>. 1 – при 20 % содержании кислорода в газовой фазе, 2 – при 5 % содержании кислорода в газовой фазе клеток на среде без тиосульфата

Для выяснения роли серных соединений в энергетическом метаболизме *Azospirillum thiophilum* sp. nov. штамма BV-S<sup>T</sup> и для определения места передачи электронов от восстановленных соединений серы (доноров электронов) в ЭТЦ было

исследовано влияние тиосульфата и ингибиторов дыхательной цепи на интенсивность дыхания клеточной суспензии *A. thiophilum* sp. nov. BV-S<sup>T</sup>.

Для опытов по изучению способности *A. thiophilum* sp. nov. к дыханию на тиосульфате с помощью полярографического метода использовали суспензию клеток, выращенных на питательной среде с лактатом, тиосульфатом и пептоном. Интенсивность дыхания на тиосульфате в аэробных условиях роста суспензии клеток в среднем составляет 2,4 - 8 нмоль/(мин·мг белка), а в микроаэробных – 67 - 300 нмоль/(мин·мг белка). Эндогенное дыхание на тиосульфате оказалось чувствительным к действию ротенона, ингибирование составило 42,6 - 60% в аэробных и микроаэробных условиях. Ингибиторный эффект HQNO и антимицина А на скорость дыхания суспензии клеток, выращенных в микроаэробных условиях составил 53,4 и 37%, соответственно (табл.2). Окисление тиосульфата чувствительно к разобшителям дыхания и окислительного фосфорилирования – С1СССР. При внесении разобшителя скорость дыхания возрастала в 2,4 раза, что непосредственно указывает на сопряженность процесса окисления тиосульфата с функционированием ЭТЦ. KCN (10мкМ) ингибирует скорость потребления кислорода клетками на 85% - 100%, что указывает на присутствие терминальной оксидазы *aa<sub>3</sub>*- типа. Применение ингибиторного анализа позволяет предположить, что процесс окисления тиосульфата сопряжен с функционированием ЭТЦ и электроны поступают в ЭТЦ на уровне убухинон – цит b – цит c участок. Таким образом, впервые показано, что штамм BV-S способен использовать тиосульфат как донор электронов в ЭТЦ, что указывает на возможность литотрофного роста.

Таблица 2. Влияние ингибиторов на тиосульфатзависимое дыхание суспензии клеток *Azospirillum thiophilum* sp. nov. штамм BV-S<sup>T</sup>, культивируемых в микроаэробных условиях роста

Скорость потребления кислорода, нмоль/(мин·мг белка) (за вычетом контролей K <sub>1</sub> и K <sub>2</sub> )	Концентрация ингибитора (мкмоль/л)	Изменение скорости дыхания после внесения ингибитора, нмоль/(мин·мг белка)	Процент ингибирования, %
67,40	HQNO (0,1)	32,22	52,2
58,03	HQNO (0,1)	27,03	53,4
300,40	Антимицин А (0,5)	189,25	37
161,00	KCN (10)	0	100
108,58	KCN (10)	2,17	98

Концентрация тиосульфата 12 ммоль/л; K<sub>1</sub> – химическое окисление; K<sub>2</sub> – эндогенное дыхание

## Заключение

Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК, позволяет рассматривать культуру BV-S<sup>T</sup> в составе рода *Azospirillum* как представителя нового вида – *Azospirillum thiophilum* sp. nov. Методом секвенирования гена 16S рРНК с последующим анализом полученной хроматограммы была показана мультикопийность рибосомного оперона в геноме *Azospirillum thiophilum* sp. nov. При этом на хроматограмме секвенированного фрагмента гена 16S рРНК в 21 позиции наблюдался двойной пик, соответствующий нуклеотидам Т и А. Согласно нашим и литературным данным, подобная

мультикопийность рибосомного оперона обуславливала метаболическую гибкость и эффективную адаптацию организма к нехарактерному для diazotрофных ассоциативных представителей рода *Azospirillum* сероводородному биотопу.

Методом полимеразной цепной реакции с последующим электрофоретическим анализом ПЦР продукта обнаружен функциональный ген *nifH*, что указывает на способность *Azospirillum thiophilum* sp. nov. штамм BV-S<sup>T</sup> к азотфиксации, характерной для рода *Azospirillum*. Но в отличие от известных представителей *Azospirillum*, *Azospirillum thiophilum* sp. nov. был способен откладывать глобулы элементарной серы внутри клеток в присутствии сульфидов.

Был исследован серный метаболизм diazотрофной бактерии *Azospirillum thiophilum* sp. nov. штамм BV-S<sup>T</sup>. Нам впервые удалось показать, что diazотрофный штамм *Azospirillum thiophilum* sp. nov. способен использовать энергию окисления восстановленных соединений серы в энергетическом метаболизме. Это подтверждается высокой активностью тиосульфатоксидоредуктазы, а так же тем, что окисление соединений серы сопряжено с функционированием ЭТЦ.

Применение ингибиторного анализа показало, что электроны от тиосульфата поступают в ЭТЦ на уровне убихинон – цит b – цит c участок. Предполагается присутствие терминальной оксидазы aa<sub>3</sub>-типа. Установлено, что основным фактором, определяющим тип метаболизма у *Azospirillum thiophilum* sp. nov. штамм BV-S<sup>T</sup> в присутствии восстановленных соединений серы, является концентрация кислорода. В микроаэробных условиях в значительной степени происходит увеличение скорости окисления восстановленных соединений серы и интенсивности дыхания на тиосульфате, а также происходит индукция синтеза фермента серного метаболизма – тиосульфатоксидоредуктазы.

### Список литературы

- 1.Гриднева Е.В. Экофизиология литотрофных сероокисляющих представителей рода *Sphaerotilus* – обитателей сульфидных источников Северного Кавказа. / Е.В. Гриднева, М.Ю. Грабович, Г.А. Дубинина и др./ Микробиология, 2009, том 78, №1, с. 1-9
- 2.Pfennig N.D. Uber das vitamin B<sub>12</sub> - bedurfuis phototropher Schwefelbakterien / N.D. Pfennig, K.D. Lippert // Arch. microbiol. - 1966. - Vol. 55, № 1. - P. 245-256.
- 3.Caraway B.H. Aerotaxis in *Spirillum volutans* / B.H. Caraway, N.R. Krieg // Can J Microbiol. - 1974. - Vol. 20. - P. 1367 – 1377.
- 4.Дубинина Г.А Методы изучения водных микроорганизмов/ Г.А.Дубинина, С.И. Кузнецов. – М.: Наука, 1989. – 288с.
- 5.Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. & Struhl K. (1994). *Current protocols in Molecular Biology*. NY: John Wiley and Sons.
- 6.Bej, A.K., Mahbubani, M.H., Dicesare, J.L. & Atlas, R.M. (1991). Polymerase chain reaction-gene probe detection of microorganisms by using filter-concentrated samples. *Appl Environ Microbiol* 57, 3529–3534.
- 7.Lane, D. G. (1991). Nucleic acids techniques in bacterial systematics, pp.115-175. Edited by E. Stackebrandt and M. Goodfellow. Chichester, United Kingdom: John Wiley.
- 8.Fedorov, D.N., Ivanova, E.G., Doronina, N.V. & Trotsenko, Yu. A. (2008). A new system of degenerative oligonucleotide primers for *nifHD* genes detection and amplification. *Microbiology* 77, 286-288.
- 9.Кретович В.Л. Обмен азота в растениях/ В.Л. Кретович; АН СССР, ин-т физиологии растений им. К.А. Тимирязева.- М.: наука,1972.-527с.



10. Крылова Н.Б. Роль микроэлементов в азотфиксации/ Н.Б. Крылова- изд-во; АН СССР, сер. биол., №5,1962.-718с.
11. Манорик А.В. Методы получения и очистки бесклеточных азотфиксирующих препаратов из различных азотфиксирующих организмов/ А.В. Манорик, Е.П. Старченков, В.К. Даценко; АН СССР, ин-т физиологии растений.- Киев: Наука думка. 1971.-71с.
12. Мишустин Е.Н. Биологическая фиксация атмосферного азота/ В.К. Шильникова - М.,1968.-С.32-37.
13. Олейников Р.Р. Физиолого-биохимические особенности клубеньковых бактерий разной азотфиксирующей активности: автореф. дис....канд. биол. наук/ Р.Р. Олейников - М.: ин-т микробиологии АН СССР , 1971.25с.
14. Шольц К.Ф. Ячейка для амперометрического определения кислорода / К.Ф. Шольц, Д.Н. Островский // Методы современной биохимии. - М., 1975. - С. 52-58.
15. Лавриненко К.С. Неассоциированный diaзотрофный представитель рода *Azospirillum*- *Azospirillum thiophilum* sp. nov., выделенный из умеренно-термального сероводородного источника Ставропольского края. / К.С. Лавриненко, Е.В. Гриднева, Е.Ю. Черноусова и др. // Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов, выпуск 10, ВГУ, 2008. – С. 133-141.
16. Klappenbach J.A., Dunbar J.M., Schmidt T.M. rRNA operon copy number reflects ecological strategies of Bacteria // Appl. Environ. Microbiol. 2000. V. 66. P. 1328-1333
17. Condon C., Liveris D., Squires C., Shwarts I., Squires C.L. rRNA operon multiplicity in *Escherichia coli* and the physiological implications of *rrn* inactivation // J. Bacteriol. 1995. V. 177. P. 4152-4156
18. Турова Т.П. Мультикопийность рибосомных оперонов прокариот и ее влияние на проведение филогенетического анализа // Микробиология. 2003. Т. 72, №4, с. 437-452

**Лавриненко Ксения Сергеевна** - аспирант, кафедра биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет, Университетская площадь, Воронеж, тел. (4732) 900-800

**Черноусова Елена Юрьевна** - аспирант, кафедра биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет, институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрабина РАН, Пушино

**Гриднева Елена Васильевна** - аспирант, кафедра биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет, Воронеж

**Логина Ольга Олеговна** - студент, кафедра биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет, Воронеж

**Сыров Владимир Михайлович** - студент, кафедра биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет, Воронеж;

**Грабович Маргарита Юрьевна** – проф, д.б.н., кафедра биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет, Воронеж

**Lavrinenko Ksenia S.** - graduate student, voronezh State University, the Biology Department, Division of Cell Biochemistry and Physiology, Voronezh, e-mail: [lavksen@mail.ru](mailto:lavksen@mail.ru)

**Chernousova Elena Yu.** - graduate student, voronezh State University, the Biology Department, Division of Cell Biochemistry and Physiology, K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Pushchino

**Gridneva Elena V.** - graduate student, voronezh State University, the Biology Department, Division of Cell Biochemistry and Physiology, Voronezh

**Loginova Olga O.** – student, voronezh State University, the Biology Department, Division of Cell Biochemistry and Physiology, Voronezh

**Sirov Vladimir M.** – student, voronezh State University, the Biology Department, Division of Cell Biochemistry and Physiology, Voronezh;

**Grabovich Margarita Yu.** – professor, Doctor of Biology, voronezh State University, the Biology Department, Division of Cell Biochemistry and Physiology, Voronezh