УДК 579.8:57.063.7

КОЛЛЕКЦИЯ РИЗОСФЕРНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ ИБФРМ РАН: РЕВИЗИЯ ШТАММОВ БАКТЕРИЙ РОДА *AZOSPIRILLUM* НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА НУКЛЕОТИДНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ГЕНА 16S рРНК



С. Н. Голубев, Е. В. Дубровская, О. В. Турковская

Голубев Сергей Николаевич, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории экологической биотехнологии, Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, sngolubev@rambler.ru

Дубровская Екатерина Викторовна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории экологической биотехнологии, Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, dubrovskaya_e@ibppm.ru

Турковская Ольга Викторовна, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией экологической биотехнологии, Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, turkovskaya_o@ibppm.ru

Коллекция ИБФРМ РАН поддерживает уникальный фонд бактериальных штаммов рода *Azospirillum*, известного своим биотехнологическим потенциалом. Динамично развивающаяся систематика этого рода требует проверки и уточнения таксономического положения изолятов, хранящихся в коллекции на протяжении длительного времени. В результате проведен сравнительный анализ полноразмерных генов 16S рРНК, который в совокупности с морфологическими, культуральными, физиолого-биохимическими свойствами, а также данными ДНК-ДНК гибридизации позволил подтвердить или установить видовую принадлежность тестируемых штаммов азоспирилл. Обнаружены представители 2 предполагаемых новых видов этого рода.

Ключевые слова: *Azospirillum*, ген 16S рРНК, ДНК-ДНК гибридизация

DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-1-52-59

Введение

Коллекция ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН (акроним IBPPM; www.collection.ibppm.ru, http://ckp-rf.ru) является специализированным научным депозитарием, деятельность которого направлена на накопление и сохранение непатогенных бактерий, выделенных главным образом из ризосферы растений. Коллекция зарегистрирована во Всемирной федерации коллекций культур (World Federation for Culture Collections, WFCC, #975) и во Всемирном центре данных о микроорганизмах (World Data Centre for Microorganisms, WDCM, #1021).

Ядро коллекции составляет крупное собрание бактерий рода *Azospirillum*, насчитывающее в настоящее время порядка 150 культур. Это штаммы азоспирилл, выделенные в основном из-под диких и культурных злаков, произрастающих в Саратовской области – одном из ведущих регионов России по селекции и выращиванию сельскохозяйственных культур. Есть изоляты из Бразилии, Индии, Сенегала, США и Эквадора. Типовые штаммы представлены двенадцатью из семнадцати описанных к настоящему времени видов азоспирилл с валидно опубликованными названиями: *A. lipoferum*, *A. brasilense*, *A. halopraeferens*, *A. doebereinerae*, *A. oryzae*, *A. melinis*, *A. canadense*, *A. zeae*, *A. picis*, *A. thiophilum*, *A. formosense* и *A. fermentarium*. В таких известных биоресурсных центрах, как, например, ATCC (American Type Culture Collection, www.lgcstandards-atcc.org) и DSMZ (Deutcsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, www.dsmz.de) общий фонд представителей рода *Azospirillum* составляет 14 и 27 штаммов, из них типовых 3 и 6 соответственно.

Род *Azospirillum* относится к семейству *Rhodospirillaceae*, входящему в порядок *Rhodospirillales* класса *Alphaproteobacteria*. Обычно представители этого таксона – подвижные грамотрицательные палочко- или спиралевидные неспорообразующие диазотрофы, накапливающие гранулы поли-β-гидроксибутирата. Основные жирные кислоты представлены $C_{16:0}$, $C_{16:0}$3-OH, $C_{18:1}$2-OH, $C_{14:0}$3-OH/iso-$C_{16:1}$, $C_{16:1}\omega7c/C_{16:1}\omega6c$ и $C_{18:1}\omega7c/C_{18:1}\omega6c$; основной дыхательный хинон – Q-10. ГЦ-состав ДНК варьирует от 64 до 71 мол. % [1–3].

Бактерии рода *Azospirillum* – общепризнанные стимуляторы роста растений. Они являются модельными объектами в исследованиях феномена растительно-микробной ассоциативности. В ассоциации с растениями эти бактерии демонстрируют свою полезность для очистки почвы от поллютантов и предотвращения почвенной эрозии [4–6]. Наиболее широко представители этого рода известны в качестве биоудобрений, успешно применяемых на коммерческом уровне в сельском хозяйстве [7]. Вместе с тем создание новых бактериальных препаратов, в составе ко-

© Голубев С. Н., Дубровская Е. В., Турковская О. В., 2018

торых присутствуют азоспириллы, остается актуальным по ряду причин. Во-первых, из-за возрастающего техногенного загрязнения окружающей среды, требующего перехода на экологически рациональное сельское хозяйство, и роста цен на химические удобрения [8]. Во-вторых, из-за особенностей взаимодействия видов/штаммов азоспирилл с различными видами растений [9]. В-третьих, из-за влияния почвенно-климатических условий на растительно-бактериальные взаимодействия [10].

Оптимальным источником отбора перспективных в качестве биоудобрений природных штаммов азоспирилл (как и представителей других бактериальных родов), адаптированных к конкретным условиям существования, могут стать специализированные коллекции, подобные нашей, объединенные в единую сеть. Работа в этом направлении уже начата силами специалистов коллекций культур Западной Европы и Российской Федерации и реализована в виде Общеевропейской сети ризосферных ресурсов (Pan-European Rhizosphere Network, PERN, http://www.pern-brio.eu), предназначенной для поддержки как научных исследований микробиома ризосферы, так и практической биотехнологии [11]. Сохранение и изучение биоразнообразия азоспирилл на базе Коллекции ризосферных микроорганизмов, интегрированной в сеть PERN, позволит систематизировать информацию о степени полезности/необходимости штаммов бактерий и их отдельных свойств для различных видов растений и условий окружающей среды, лучше понимать взаимодействия в системе растения-бактерии и, следовательно, предоставит возможность управления аграрными экосистемами.

Цель настоящей работы заключалась в пополнении таксономически значимых свойств штаммов азоспирилл из Коллекции ризосферных микроорганизмов результатами анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК и последующей корректировке таксономического положения изолятов на основании совокупности полученных гено- и фенотипических данных.

Материал и методы

Бактериальные культуры рода *Azospirillum*, использованные в этой работе (табл. 1), культивировали на чашках с картофельным агаром. Выделение геномной ДНК из единичной колонии бактериальной культуры осуществляли с помощью набора реагентов Genomic DNA Purification Kit (Fermentas), следуя протоколу производителя. Полноразмерный ген 16S рРНК амплифицировали на термоциклере T100^{TM} (Bio-Rad Laboratories, США) с использованием набора праймеров 27f: 5’-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3’ и 1492r: 5’-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3’ [12]. Реакционную смесь готовили, применяя набор 2×PCR Master Mix (Fermentas), как рекомендовано производителем. Наличие ПЦР-продуктов ожидаемого размера проверяли электрофорезом в 0,7% агарозном геле на трис-ацетатном буфере в соответствии с рекомендациями [13], применяя в качестве маркеров молекулярных размеров набор фрагментов ДНК FastRuler^{TM} DNA Ladder, High Range (Fermentas). Визуализацию и документирование результатов гель-электрофореза осуществляли посредством системы BDA digital (Biometra, Германия). Определение нуклеотидной последовательности полученных ПЦР-продуктов проводили в научно-производственной компании «Синтол» (Москва, www.syntol.ru) на секвенаторе ABI 3130xl (Applied Biosystems Inc., США) с использованием набора BigDye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems Inc., США) в соответствии с протоколом производителя. Поиск гомологов и расчет величин попарного сходства нуклеотидных последовательностей этого гена проводили на сервере AzBioCloud (http://www.ezbiocloud.net) [14]. Реконструкцию филогенетических деревьев осуществляли с помощью MEGA 6 [15].

Для дот-гибридизации ДНК-ДНК использовали нитроцеллюлозные фильтры (BA-85/20, S&S). Мечение ДНК (^{3}H-дезоксинуклеотидтрифосфаты) «ник»-трансляцией, нанесение ДНК на фильтры и гибридизацию проводили по традиционным методикам [13, 16, 17].

Результаты и их обсуждение

Предварительная идентификация тестируемых в настоящей работе штаммов рода *Azospirillum* из Коллекции ризосферных микроорганизмов (см. табл. 1) была осуществлена сотрудниками группы коллекционных культур ИБФРМ, заложившими основу этого уникального собрания бактерий [18]. Все штаммы – микроаэрофилы. По Граму красились отрицательно и имели присущие азоспириллам морфологические признаки: короткие палочки (~1.0×1.5 мкм), округлые на концах, спиральной формы, с характерным винтообразным движением. Их колонии на диагностической малатно-солевой среде мелкие (∅ 2–3 мм), сухие, полупрозрачные, белые или слегка розовые, похожие на таковые у *A. lipoferum*, *A. brasilense* и *A. doebereinerae* [19]. На среде с конго-красным – красителем, который, как известно, адсорбируется клетками таких видов, как *A. brasilense*, *A. lipoferum*,

Таблица 1

Характеристика штаммов рода *Azospirillum* из Коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН

Шифр штамма (Кат. №)	Источник выделения	Предварительная идентификация	
		Таксон	Дифференциально-диагностические признаки
SR7 (IBPPM4)	*Dactylis glomerata*, корни	*Azospirillum* sp.	Культуральные, морфологические и физиолого-биохимические; 25% гомология с ДНК *A. brasilense* Sp7^T
SR15 (IBPPM7)	*Dactylis glomerata*, корни	*A. brasilense*	Культуральные, морфологические и физиолого биохимические; 74% гомология с ДНК *A. brasilense* Sp7^T [18]
SR41 (IBPPM33)	*Triticum aestivum* (Альбидум 43), корни	*A. brasilense*	Культуральные, морфологические и физиолого-биохимические; 75% гомология с ДНК *A. brasilense* Sp7^T
SR50 (IBPPM17)	*Triticum aestivum* (Саратовская 52), корни	*A. brasilense*	Культуральные, морфологические и физиолого-биохимические; 71% гомология с ДНК *A. brasilense* Sp7^T
SR55 (IBPPM18)	*Triticum durum* (Харьковская 46), корни	*A. brasilense*	Культуральные, морфологические и физиолого-биохимические; 100% гомология с ДНК *A. brasilense* Sp7^T [18]
SR57 (IBPPM41)	*Triticum aestivum* (Опал 69), корни	*Azospirillum* sp.	Культуральные, морфологические и физиолого-биохимические
SR80 (IBPPM24)	*Triticum aestivum* (Саратовская 49), проростки	*A. brasilense*	Культуральные, морфологические и физиолого-биохимические; 80% гомология с ДНК *A. brasilense* Sp7^T [18]
SR88 (IBPPM25)	*Triticum durum* (Харьковская 46), проростки	*A. brasilense*	Культуральные, морфологические и физиолого-биохимические; 73% гомология с ДНК *A. brasilense* Sp7^T
SR96 (IBPPM53)	*Triticum durum* (Мелянопус 1861), проростки	*Azospirillum* sp.	Культуральные, морфологические и физиолого-биохимические
SR100 (IBPPM28)	*Secale cereale* (Одесская), проростки	*Azospirillum* sp.	Культуральные, морфологические и физиолого-биохимические; 18% гомология с ДНК *A. brasilense* Sp7^T
SR103 (IBPPM29)	*Avena sativa* (Руслан), корни	*Azospirillum* sp.	Культуральные, морфологические и физиолого-биохимические
SR105 (IBPPM294)	*Avena sativa* (Укосный 550), проростки	*Azospirillum* sp.	Культуральные, морфологические и физиолого-биохимические
SR108 (IBPPM297)	*Zea mays* (Саратовская 167-Б), проростки	*Azospirillum* sp.	Культуральные, морфологические и физиолого-биохимические
SR109 (IBPPM430)	*Zea mays* (Зубовидная), проростки	*A. brasilense*	Культуральные, морфологические и физиолого-биохимические; 78% гомология с ДНК *A. brasilense* Sp7^T
SR111 (IBPPM31)	*Panicum miliaceum* (Саратовское 853), корни	*A. brasilense*	Культуральные, морфологические и физиолого-биохимические; 70% гомология с ДНК *A. brasilense* Sp7^T
SR115 (IBPPM32)	*Sorghum saccharatum* (Саратовское сахарное), проростки	*Azospirillum* sp.	Культуральные, морфологические и физиолого-биохимические

A. doebereinerae, *A. largimobile*, они очень мелкие (∅ 0,5–2 мм), ярко-красного цвета, сухой консистенции, округлые или неправильной формы с волнистым краем, морщинистой поверхностью и бороздами, расходящимися радиально из центра колонии. На картофельном агаре колонии среднего размера (∅ 2–8 мм), округлые, полупрозрачные с плотным центром, сначала непигментированные, а позднее окрашивающиеся в розоватый цвет. Подобная морфология колоний на этой среде присуща *A. lipoferum*, *A. brasilense* и *A. doebereinerae* [19]. По физиолого-биохимическим свойствам идентифицируемые штаммы были ближе к *A. brasilense* (табл. 2). Но при этом следует учитывать, что на момент идентификации было описано только 4 вида азоспирилл: *A. brasilense*, *A. lipoferum*, *A. halopraeferens* и *A. amazonense*, последний из которых был реклассифицирован в *Nitrospirillum amazonense* [1]. Высокая степень сходства ДНК штаммов SR15, SR41, SR50, SR55, SR80, SR88, SR109 и SR111 с типовым штаммом *A. brasilense* Sp7 позволила отнести их к виду *A. brasilense* (см. табл. 1). Согласно [20] ДНК-ДНК гибридизация рекомендована как метод для определения бактерий на уровне вида, а 70% уровень подобия ДНК – как условная граница разделения видов. В отсутствии значимых генотипических данных идентифицировать до вида оставшиеся штаммы не представлялось возможным, и они были определены как *Azospirillum* sp.

В настоящее время назрела необходимость проверки таксономического положения штаммов азоспирилл, на протяжении долгого времени поддерживаемых в Коллекции ризосферных микроорганизмов, что особенно актуально на фоне увеличившегося числа (до 17) описанных видов этого рода бактерий с валидно опубликованными названиями [3]. Для этой цели подходящим и достаточно надежным методом (хотя и имеющим некоторые ограничения) является филогенетический анализ, основанный на сравнении полноразмерных нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК [14, 21].

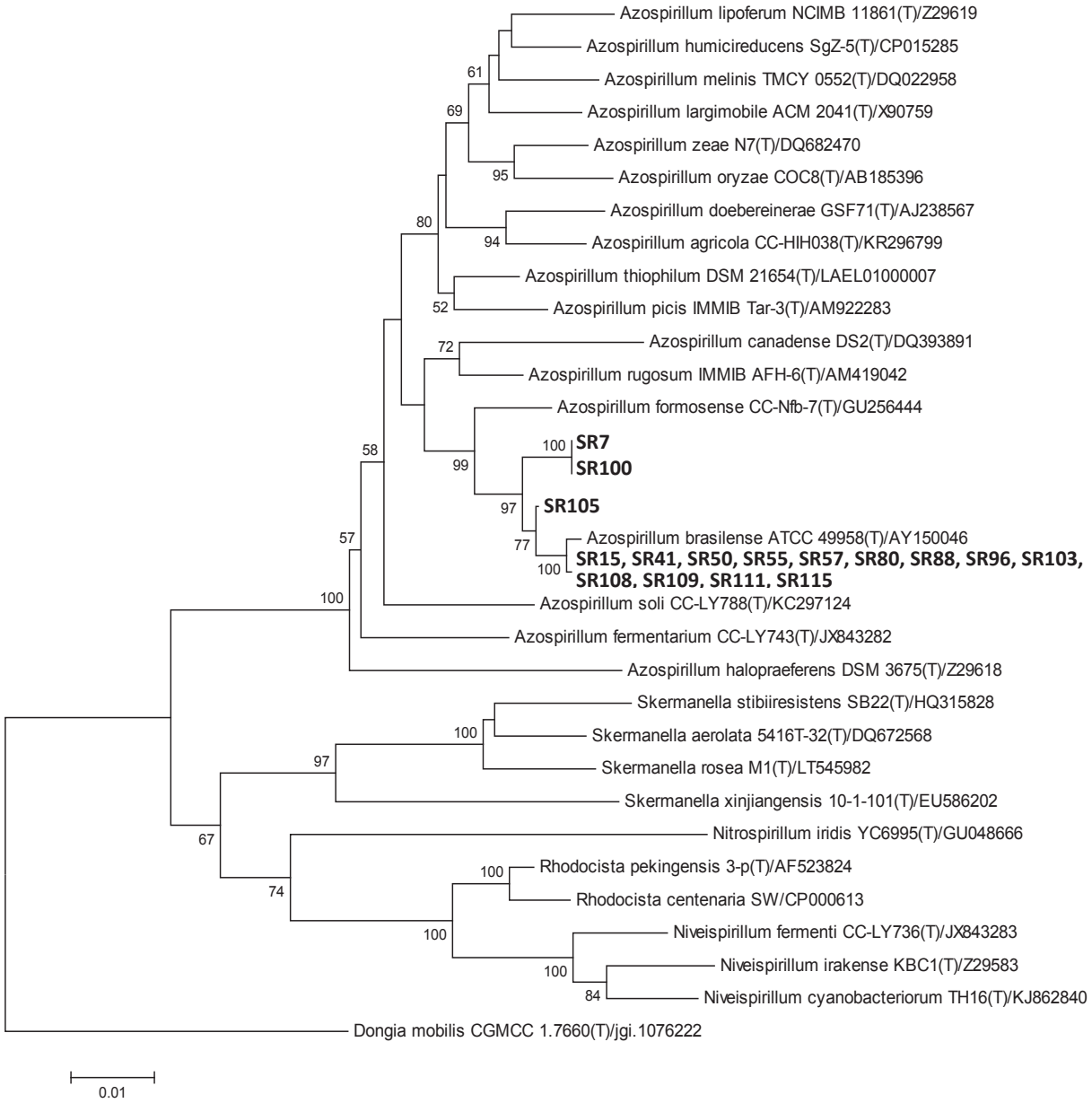
Согласно проведенному филогенетическому анализу (рисунок) все исследуемые штаммы занимают прочное положение среди представителей рода *Azospirillum* и группируются с типовым штаммом вида *A. brasilense*. Однако внутри этого кластера наблюдается разделение штаммов на 2 субклады. Одна из них, наряду с типовым штаммом вида, включает штаммы SR15, SR41, SR50, SR55, SR80, SR88, SR109 и SR111, которые ранее на основании совокупности морфологических, культуральных и физиолого-биохимических свойств, а также данных ДНК-ДНК гибридизации были отнесены к виду *A. brasilense*. В эту же кладу вошли штаммы SR57, SR96, SR103, SR108 и SR115, тяготеющие к вышеуказанному виду азоспирилл по своим фенотипическим признакам. При этом нуклеотидные последовательности гена 16S рРНК всех этих 13 штаммов практически идентичны. Уровень их сходства выше пороговой величины 98,65%, предложенной для разграничения видов прокариот [21] и используемой в обновленной версии облачного сервиса EzBioCloud (http://www.ezbiocloud.net) [14], отмечается только в отношении типового штамма вида *A. brasilense*, составляя 99,72–99,78%. Штамм SR105 не так тесно связан с типовым штаммом *A. brasilense* по сравнению с остальными представителями рассматриваемой субклады. Но эта связь все равно не выходит за пределы вида: значимый уровень сходства SR105 имеет только с *A. brasilense* (98,98%). Перечень выявленных у штамма SR105 морфологических, культуральных и физиолого-биохимических свойств не противоречит результатам анализа гена 16S рРНК. Важно подчеркнуть, что в геноме типового штамма *A. brasilense* обнаружено несколько копий гена 16S рРНК: на хромосоме локализованно 2 копии, на плазмидах ABSP7_p1 – 3 копии, ABSP7_p2 – 2 копии и на ABSP7_p3 – 3 копии (NCBI, Bioproject "*Azospirillum brasilense* strain: Sp7 Genome sequencing", Accession PRJNA293508, ID 293508). Тем не менее их сравнение между собой посредством алгоритма попарного глобального выравнивания, рекомендованного для использования в таксономических целях [14, 21, 24], показывает уровень сходства в диапазоне 98,61–100%, то есть практически не выходит за пределы внутривидовой нормы, предложенной в [21]. Отмеченный факт согласуется с результатами оценки изменчивости гена 16S рРНК в геномах *Azospirillum* sp. B510, *A. thiophilum* BV-S^T, *A. brasilense* Sp7^T, *A. brasilense* Az39 и *A. lipoferum* 4B [25], согласно которым самая высокая степень внутригеномной дивергенции гена имело место в последнем случае – 1,73%, не превышая в остальных 0,90%. Отличие диапазона величин сходства различных копий гена 16S рРНК в геноме *A. brasilense* Sp7^T (99,10–100%) по сравнению с аналогичными данными, полученными нами (98,61–100%), объясняется способом расчета: авторы цитируемого исследования для этих целей использовали значения матрицы идентичности, генерируемой в результате множественного выравнивания нуклеотидных последовательностей. Таким образом, на основании имеющейся информации можно сделать заключение о принадлежности штаммов SR15, SR41, SR50, SR55, SR57, SR80, SR88, SR96, SR103, SR105, SR108, SR109, SR111 и SR115 к виду *A. brasilense*.

Таблица 2

Физиологические и биохимические характеристики, дифференцирующие виды внутри рода *Azospirillum*

Штаммы	Оксидаза	Каталаза	Уреаза	Гидролиз желатина	Рост с 3% NaCl	Потребность в биотине	Утилизация единственных источников углерода						
							ARA	GAL	GLU	FRU	MAN	SOR	GLY
SR7, SR15–SR115	+	+	+	–	v	–	v	v	–	+	–	–	+
A. brasilense Sp7^T	+	+	+	–	v	–	v	v	v	+	–	–	+
A. lipoferum Sp59b^T	–	–	–	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+
A. halopraeferens Au4^T	+	+	+	н.о.	+	+	v	–	–	+	+	–	+
A. largimobile ACM2041^T	+	+	+	–	–	–	+	+	+	+	+	+	+
A. doebereinerae GSF71^T	+	+	+	–	–	–	+	v	v	+	+	+	+
A. oryzae COC8^T	+	+	+	–	–	+	+	+	+	+	–	–	+
A. melinis TMCY0552^T	н.о.	н.о.	н.о.	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+
A. canadense DS2^T	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
A. zeae N7^T	+	+	+	–	–	–	+	+	v	+	+	+	+
A. rugosum IMMIB AFH-6^T	+	+	+	–	–	н.о.	–	–	–	+	–	–	+
A. picis IMMIB TAR-3^T	+	+	+	–	–	–	+	+	+	+	+	+	+
A. thiophilum BV-S^T	+	+	–	–	+	–	+	+	+	+	+	+	+
A. formosense CC-Nfb-7^T	+	+	–	–	–	–	+	+	+	+	–	–	+
A. humicireducens SgZ-5^T	+	+	+	–	–	–	+	н.о.	+	н.о.	+	+	н.о.
A. fermentarium CC-LY743^T	+	+	+	–	+	–	–	+	–	–	н.о.	+	–
A. soli CC-LY788^T	+	+	н.о.	н.о.	–	н.о.	+	н.о.	–	н.о.	н.о.	н.о.	–
A. agricola CC-HIH038^T	+	+	+	+	–	н.о.	+	+	–	+	–	–	+

Примечание. Характеристики типовых штаммов получены из [1] и оригинальных работ по описанию видов азоспирилл, включая [2, 3]. Все исследуемые, а также типовые штаммы известных видов азоспирилл накапливают в клетках гранулы поли-β-гидроксибутирата и все они способны к нитратредукции. ARA – L-арабиноза, GAL – D-галактоза, GLU – D-глюкоза, FRU – D-фруктоза, MAN – D-маннит, SOR – D-сорбит, GLY – глицерин, “+” – положительный, “–” – отрицательный, v – вариабельный, н.о. – не определяли.



Филограмма изолятов SR7, SR15, SR41, SR50, SR55, SR57, SR80, SR88, SR96, SR100,SR103, SR105, SR108, SR109, SR111 и SR115, основанная на сравнении нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК. Для построения филограммы использован метод объединения соседей [22], для расчета эволюционных расстояний – трехпараметрическая модель Тамуры [23] с учетом неравномерности скоростей замен в последовательностях, следующих гамма-распределению. Указаны значения статистической достоверности порядка ветвления (бутстрэп тест) для 1000 альтернативных деревьев (≥50%). Номера последовательностей в GenBank приведены после названий штаммов. Масштаб: одна замена на каждые 100 нуклеотидов

Отдельную субкладу в кластере *A. brasilense* формируют штаммы SR7 и SR100. Несмотря на то что указанные штаммы филогенетически близки виду *A. brasilense* и по выявленным фенотипическим признакам не отличаются от его типичных представителей, они, вероятно, не принадлежат этому таксону. На это указывают результаты, полученные с применением двух классических подходов определения границ прокариотического вида, используемых в современной таксономии, – анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК и ДНК-ДНК гибридизации. Так, наилучшее сходство по гену 16S рРНК SR7 и SR100 показывают с типовым штаммом *A. brasilense*: 98,22 и 98,25% соответственно, что находится ниже видового порога отсечения в 98,65% согласно [21]. ДНК-ДНК гомология SR7 и SR100 в отношении типового

штамма *A. brasilense* составила 25 и 18% соответственно, в то время как к одному виду, как правило, относят штаммы, имеющие не менее 70% сходства [20]. Учитывая данные перекрестной ДНК-ДНК гибридизации, согласно которым SR7 и SR100 обладают 56% уровнем гомологии, указанные штаммы, вероятно, являются представителями разных видов. Таким образом, представленные результаты дают основание рассматривать SR7 и SR100 в качестве претендентов на выделение в новые виды внутри рода *Azospirillum*. Окончательное решение по этому вопросу может быть сделано только в рамках так называемого «полифазного» подхода, то есть получив комплекс таксономически значимых характеристик, позволяющих отличать предполагаемые новые виды друг от друга и от ранее описанных видов азоспирилл на уровне гено- и фенотипа, а также пополнив каждый из таких таксонов несколькими независимо выделенными представителями [26].

Заключение

Таксономическая характеристика 16 штаммов азоспирилл, поддерживаемых в Коллекции ризосферных микроорганизмов, дополнена результатами анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК. С учетом совокупности полученных данных подтверждена принадлежность SR15, SR41, SR50, SR55, SR80, SR88, SR109, SR111 к виду *A. brasilense*. Осуществлена видовая дифференциация (до *A. brasilense*) нескольких штаммов *Azospirillum* sp.: SR57, SR96, SR103, SR105, SR108 и SR115. Представлены свидетельства возможной принадлежности штаммов SR7 и SR100 к новым видам рода *Azospirillum*, но близкородственным *A. brasilense*.

Список литературы

1. *Baldani J. I., Videira S. S., Dos Santos Teixeira K. R., Reis V. M., De Oliveira A. L. M., Schwab S., De Souza E. M., Pedraza R. O., Baldani V. L. D., Hartmann A.* The family *Rhodospirillaceae* // The Prokaryotes: Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria / eds. E. Rosenberg, E.F. DeLong, S. Lory, E. Stackebrandt, F. Thompson. Berlin ; Heidelberg : Springer, 2014. P. 533–618.
2. *Lin S.-Y., Hameed A., Liu Y.-C., Hsu Y.-H., Lai W.-A., Shen F.-T., Young C.-C. Azospirillum soli* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from agriculture soil // Intern. J. Syst. Evol. Microbiol. 2015. Vol. 65. P. 4601–4607.
3. *Lin S.-Y., Liu Y.-C., Hameed A., Hsu Y.-H., Huang H.-I., Lai W.-A., Young C.-C. Azospirillum agricola* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from cultivated soil // Inter. J. Syst. Evol. Microbiol. 2016. Vol. 66. P. 1453–1458.
4. *Huang X.-D., El-Alawi Y., Penrose D. M., Glick B. R., Greenberg B. M.* Responses of three grass species to creosote during phytoremediation // Environ. Pollut. 2004. Vol. 130. P. 453–463.
5. *Huang X.-D., El-Alawi Y., Penrose D. M., Glick B. R., Greenberg B. M.* A multi-process phytoremediation system for removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soils // Environ. Pollut. 2004. Vol. 130. P. 465–476.
6. *Муратова А. Ю., Турковская О. В., Антонюк Л. П., Макаров О. Е., Позднякова Л. И., Игнатов В. В.* Нефтеокисляющий потенциал ассоциативных ризобактерий рода *Azospirillum* // Микробиология. 2005. Т. 74, № 2. С. 248–254.
7. *Mehnaz S. Azospirillum* : A Biofertilizer for Every Crop // Plant Microbes Symbiosis: Applied Facets / ed. N. K. Arora. New Delhi : Springer, 2015. P. 297–314.
8. *Hungria M., Campo R. J., Souza E. M., Pedroza F. O.* Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil // Plant Soil. 2010. Vol. 331. P. 413–425.
9. *Pereg L., de-Bashan L. E., Bashan Y.* Assessment of affinity and specificity of *Azospirillum* for plants // Plant Soil. 2016. Vol. 399. P. 389–414.
10. *Lucy M., Reed E., Glick B. R.* Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria // Antonie van Leeuwenhoek. 2004. Vol. 86. P. 1–25.
11. *Declerck S., Willems A., Heijden van der M. G., Varese G. C., Turkovskaya O., Evtushenko L., Ivshina I., Desmeth P.* PERN : An EU-Russia initiative for rhizosphere microbial resources // Trends Biotechnol. 2015. Vol. 33. P. 377–380.
12. *Lane D. J.* 16S/23S rRNA sequencing // Nucleic acid techniques in bacterial systematics / eds. E. Stackebrandt, M. Goodfellow. Chichester : John Wiley and Sons, 1991. P. 115–175.
13. *Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж.* Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование : пер. с англ. М. : Мир, 1984. 480 с.
14. *Yoon S. H., Ha S. M., Kwon S., Lim J., Kim Y., Seo H., Chun J.* Introducing EzBioCloud : A taxonomically united database of 16S rRNA and whole genome assemblies // Intern. J. Syst. Evol. Microbiol. 2017. Vol. 67. P. 1613–1617.
15. *Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S.* MEGA6 : Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0 // Mol. Biol. Evol. 2013. Vol. 30. P. 2725–2729.
16. Методы общей бактериологии / под ред. Ф. Герхарда [и др.] : в 3 т. М. : Мир, 1984. Т. 3. 264 с.
17. Nucleic acid hybridization : a practical approach / eds. B. D. Hames, S. J. Higgins. Oxford ; Washington, DC : I.R.S. Press, 1985. 245 p.
18. *Позднякова Л. И., Каневская С. В., Леванова Г. Ф., Барышева Н. Н., Пилипенко Т. Ю., Богатырев В. А., Федорова Л. С.* Таксономическое изучение азоспирилл, выделенных из злаков Саратовской области // Микробиология. 1988. Т. 57, № 2. С. 275–278.
19. *Hartmann A., Baldani J. I.* The genus *Azospirillum* // The Prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria /

eds. M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K-H. Schleifer, E. Stackebrandt. New York : Springer, 2006. Vol. 5. P. 115–140.

20. *Wayne L. G., Brenner D. J., Colwell R. R., Grimont P. A. D., Kandler O., Krichevsky M. I., Moore L. H., Moore W. E. C., Murray R. G. E., Stackebrandt E., Starr M. P., Truper H. G.* Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics // Intern. J. Syst. Bacteriol. 1987. Vol. 37. P. 463–464.
21. *Kim M., Oh H. S., Park S. C., Chun J.* Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes // Intern. J. Syst. Evol. Microbiol. 2014. Vol. 62. P. 716–721.
22. *Saitou N., Nei M.* The neighbor-joining method : A new method for reconstructing phylogenetic trees // Mol. Biol. Evol. 1987. Vol. 4. P. 406–425.
23. *Tamura K.* Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+C-content biases // Mol. Biol. Evol. 1992. Vol. 9. P. 678–687.
24. *Tindall B. J., Rossello-Mora R., Busse H.-J., Ludwig W., Kampfer P.* Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes // Intern. J. Syst. Evol. Microbiol. 2010. Vol. 60. P. 249–266.
25. *Maronichea G. A., García J. E., Salcedo F., Creus C. M.* Molecular identification of *Azospirillum* spp. : Limitations of 16S rRNA and qualities of *rpo*D as genetic markers // Microbiol. Res. 2017. Vol. 195. P. 1–10.
26. *Oren A., Garrity G. M.* Then and now: a systematic review of the systematics of prokaryotes in the last 80 years // Antonie van Leeuwenhoek. 2014. Vol. 106. P. 43–56.

Rhizosphere Microorganisms' Collection of IBPPM RAS: Revision of *Azospirillum* Strains Based on 16S rRNA Gene Sequence Analysis

S. N. Golubev, E. V. Dubrovskaya, O. V. Turkovskaya

Sergey N. Golubev, ORCID iD 0000-0002-0021-4936, Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganusms, Russian Academy of Science, 13, Entuziastov Ave., Saratov, 410049, Russia, sngolubev@rambler.ru

Ekaterina V. Dubrovskaya, ORCID iD 0000-0001-7944-6483, Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganusms, Russian Academy of Science, 13, Entuziastov Ave., Saratov, 410049, Russia, dubrovskaya_e@ibppm.ru

Olga V. Turkovskaya, ORCID iD 0000-0003-4501-4046, Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganusms, Russian Academy of Science, 13, Entuziastov Ave., Saratov, 410049, Russia, turkovskaya_o@ibppm.ru

The IBPPM Collection maintains unique pool of bacterial strains related to *Azospirillum* genus, notable for its biotechnological potential. Progressively developing systematics of this genus requires checking and clarifying the taxonomic position for long-term stored isolates in the collection. Consequently, the species membership was confirmed or defined in the tested *Azospirillum* strains using a comparative analysis of their full-length 16S rRNA genes combined with morphological, cultural, physiological and biochemical properties, as well as DNA-DNA hybridization data. Members of two proposed new *Azospirillum* species were found.

Key words: *Azospirillum*, 16S rRNA gene, DNA-DNA hybridization.

Образец для цитирования:

Голубев С. Н., Дубровская Е. В., Турковская О. В. Коллекция ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН : ревизия штаммов бактерий рода *Azospirillum* на основе анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК // Изв. Сарат. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2018. Т. 18, вып. 1. С. 52–59. DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-1-52-59.

Cite this article as:

Golubev S. N., Dubrovskaya E. V., Turkovskaya O. V. Rhizosphere Microorganisms' Collection of IBPPM RAS: Revision of *Azospirillum* Strains Based on 16S rRNA Gene Sequence Analysis. *Izv. Saratov Univ. (N.S.), Ser. Chemistry. Biology. Ecology*, 2018, vol. 18, iss. 1, pp. 52–59 (in Russian). DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-1-52-59.