


Посвящается светлой памяти Людмилы Ивановны Поздняковой,  
внесшей неоценимый вклад в создание и развитие коллекции

## Коллекция ризосферных микроорганизмов: значение для исследования растительно-бактериальной ассоциативности

О.В. Турковская , С.Н. Голубев

<sup>1</sup> Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук, Саратов, Россия

 e-mail: turkovskaya\_o@ibppm.ru

**Аннотация.** Коллекции микроорганизмов – один из важнейших компонентов биологической науки, который обеспечивает исследователей необходимым материалом и сохраняет биологические ресурсы. Таковой является Коллекция ризосферных микроорганизмов Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук (ИБФРМ РАН), деятельность которой сосредоточена в первую очередь на выделении и сохранении микроорганизмов, выделенных из корневой зоны растений. Интерес мировой науки к микроорганизмам этой экологической ниши не ослабевает по причине их большой значимости для роста и развития растений и, следовательно, для растениеводства. Группа бактерий, обладающих полезными для растений свойствами, получила название PGPR (plant growth promoting rhizobacteria – стимулирующие рост растений ризобактерии). К ним относятся и почвенные азотфиксирующие альфа-протеобактерии рода *Azospirillum*, составляющие ядро вышеназванной коллекции. Азоспириллы, открытые в 70-х гг. прошлого века бразильскими учеными, в настоящее время являются признанными во всем мире модельными объектами для изучения молекулярных механизмов растительно-микробных взаимодействий. Фиксация атмосферного азота, продукция фитогормонов, солюбилизация фосфатов, контроль патогенов, формирование у растений индуцированной системной устойчивости – целый комплекс полезных свойств делает их универсальным инструментом для фундаментальных исследований и практического применения. В обзоре обсуждается современное состояние исследований по бактериям рода *Azospirillum* с акцентом на результатах, полученных коллективом ИБФРМ РАН (г. Саратов). Экспедиции по Саратовской области, проведенные микробиологами института в начале 1980-х гг., заложили основу уникального собрания представителей этого бактериального таксона, которое сегодня включает более 160 штаммов и считается одним из самых крупных в Европе. Исследования сотрудников ИБФРМ РАН преимущественно сосредоточены на структурах азоспирилл, вовлеченных в образование ассоциативного симбиоза с растениями. Прежде всего это внеклеточные полисахаридсодержащие комплексы и лектины. Развитие методов иммунохимии во многом позволило выяснить, как в целом организована поверхность бактерий. Благодаря изучению генома азоспирилл существенно углубилось понимание роли вышеупомянутых структур, а также подвижности бактерий и формирования ими биопленок при заселении корней. В прикладном аспекте заслуживают внимания исследования азоспирилл, направленные на развитие агро- и экотехнологий, а также технологии «зеленого» синтеза наночастиц золота, серебра и селена. Коллекция продолжает развиваться, пополняясь новыми штаммами, показывая большое значение специализированных собраний микроорганизмов для создания и поддержания исследовательской базы и эффективного решения фундаментальных и прикладных задач микробиологии.


Ключевые слова: коллекция микроорганизмов; *Azospirillum*; ризосфера; стимулирующие рост растений ризобактерии; ассоциативный симбиоз.

**Для цитирования:** Турковская О.В., Голубев С.Н. Коллекция ризосферных микроорганизмов: значение для исследования растительно-бактериальной ассоциативности. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2020;24(3):315-325. DOI 10.18699/VJ20.623

## The Collection of Rhizosphere Microorganisms: its importance for the study of associative plant-bacterium interactions

O.V. Turkovskaya , S.N. Golubev

Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms of the Russian Academy of Sciences, Saratov, Russia

 e-mail: turkovskaya\_o@ibppm.ru

**Abstract.** Microbial culture collections are very important components of biological science. They provide researchers with material for studies and preserve biological resources. One such collection is the Collection of Rhizosphere Microorganisms, kept at the Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms of the Russian Academy of Sciences,

Saratov (IBPPM). Its activity is primarily directed toward the isolation and preservation of microorganisms from the plant root zone. The international research interest in microorganisms from this ecological niche is not waning, because they are very important for plant growth and development and, consequently, for plant breeding. The group of bacteria with properties of significance for plants has been given the name "plant-growth-promoting rhizobacteria" (PGPR). This group includes nitrogen-fixing soil alpha-proteobacteria of the genus *Azospirillum*, which form the core of the IBPPM collection. First discovered by Brazilian scientists in the 1970s, azospirilla are now a universally recognized model object for studying the molecular mechanisms underlying plant-bacterium interactions. The broad range of useful properties found in these microorganisms, including the fixation of atmospheric nitrogen, production of phytohormones, solubilization of phosphates, control of pathogens, and formation of induced systemic resistance in the colonized plants, make these bacteria an all-purpose tool that has been used for several decades in basic and applied research. This article reviews the current state of *Azospirillum* research, with emphasis on the results obtained at the IBPPM. Scientific expeditions across the Saratov region undertaken by IBPPM microbiologists in the early 1980s formed the basis for the unique collection of members of this bacterial taxon. Currently, the collection has more than 160 *Azospirillum* strains and is one of the largest collections in Europe. The research conducted at the IBPPM is centered mostly on the *Azospirillum* structures involved in associative symbiosis with plants, primarily extracellular polysaccharide-containing complexes and lectins. The development of immunochemical methods contributed much to our understanding of the overall organization of the surface of rhizosphere bacteria. The extensive studies of the *Azospirillum* genome largely deepened our understanding of the role of the aforesaid bacterial structures, motility, and biofilms in the colonization of host plant roots. Of interest are also applied studies focusing on agricultural and environmental technologies and on the "green" synthesis of Au, Ag, and Se nanoparticles. The Collection of Rhizosphere Microorganisms continues to grow, being continually supplemented with newly isolated strains. The data presented in this article show the great importance of specialized microbial culture repositories, such as the IBPPM collection, for the development and maintenance of the microbial research base and for the effective solution of basic and applied tasks in microbiology.

**Key words:** microbial culture collection; *Azospirillum*; rhizosphere; plant-growth-promoting rhizobacteria; associative symbiosis.

**For citation:** Turkovskaya O.V., Golubev S.N. The Collection of Rhizosphere Microorganisms: its importance for the study of associative plant-bacterium interactions. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2020;24(3):315-325. DOI 10.18699/VJ20.623

## Введение

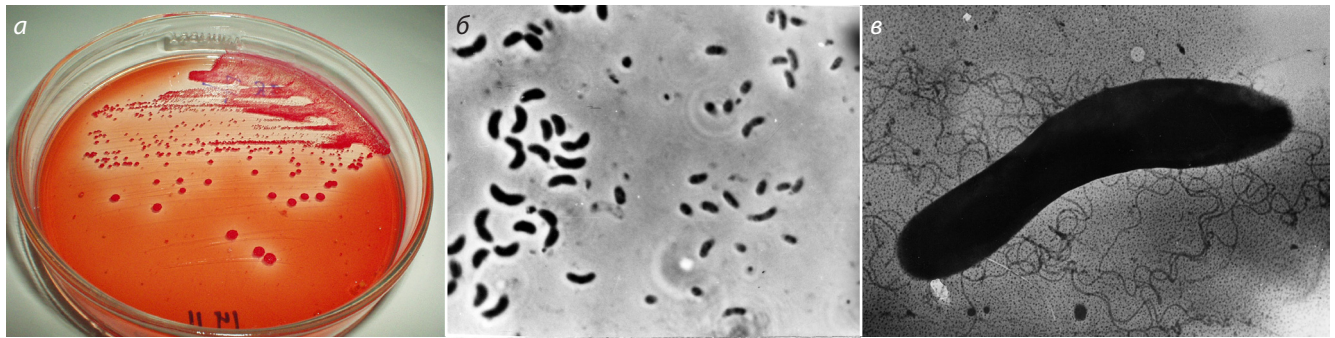
Сохранение и развитие биологических коллекций на территории Российской Федерации является частью приоритетной межведомственной и междисциплинарной проблемы сохранения биоресурсов, биоразнообразия, укрепления био- и продовольственной безопасности государства, решение которой служит основой устойчивого развития российской науки в целом, современных наукоемких производств, подготовки квалифицированных кадров (Рекомендации «круглого стола»..., 2011). По данным Всемирной федерации коллекций культур (World Federation for Culture Collections, WFCC), на сегодняшний день насчитывается 715 коллекций (<http://www.wfcc.info/ccinfo>). Они условно делятся на три категории (Калакуцкий и др., 1996; Ившина, 2012): широкого профиля (сервисные, комплексные, общественные), специализированные (для изучения и сохранения микроорганизмов конкретных групп для конкретных целей) и исследовательские (частные, узкоспециальные). До недавнего времени весьма многочисленные российские коллекции находились на грани прекращения своей деятельности из-за отсутствия достаточного финансирования. В последние годы, с утверждением Плана «Развития биотехнологий и геной инженерии» (Распоряжение Правительства РФ, 2013) делается попытка оказания целевой организационной и финансовой поддержки активно работающим коллекциям.

В указанный выше План входит создание крупных биоресурсных центров (БРЦ), которые станут важнейшим элементом, обеспечивающим развитие биотехнологии в России (Калакуцкий, Озерская, 2011), интеграцию в европейскую и глобальную (мировую) информационные

сети биологических ресурсов. Следует отметить, что в мире уже довольно много БРЦ, которые представлены как ведомственными, так и частными некоммерческими организациями. В 2014 г. на базе одной из ведущих российских коллекций был создан Национальный биоресурсный центр – Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов (БРЦ ВКПМ), призванный стать основой инфраструктуры в области микробных генетических ресурсов биотехнологического назначения, необходимой для обеспечения исследований в области живых систем (<http://www.genetika.ru/vkpm>). На статус БРЦ может претендовать еще ряд крупных российских коллекций. Большая же часть собраний, представленная специализированными коллекциями при научных и учебных организациях, не соответствует критериям таких крупных структур, однако заслуживает не меньшего внимания. Как правило, эти коллекции обладают одновременно значительным массивом культур и наиболее полной информацией о них, что дает им существенное преимущество. Именно такой является Коллекция ризосферных микроорганизмов Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук (ИБФРМ РАН).

## Коллекция ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН

Созданный в Саратове в 1980 г. Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Академии наук СССР был ориентирован на исследования, связанные с задачами повышения урожайности сельскохозяйственных культур в Поволжском регионе. Одной из задач было обоснование возможности использования микробиологического удобрения и в связи с этим выяснение роли



Визуализация бактерий рода *Azospirillum*:

а – рост на картофельном агаре; б – клетки на жидкой среде, 18 ч, фазовый контраст; в – клетка под электронным микроскопом, 18 ч, ×25000, контрастировано уранил-ацетатом (Позднякова и др., 1988).

ассоциативных азотфиксирующих микроорганизмов в обеспечении азотным питанием зерновых культур. Для ее решения в качестве одного из модельных объектов исследований была выбрана diaзотрофная бактерия азоспирилла (род *Azospirillum*), первые публикации о которой на тот момент только появились в научной печати (Tarrand et al., 1978). Микробиологи института освоили методы изоляции и идентификации этих микроорганизмов, отработали способы их консервации. Экспедиции по Саратовской области, предпринятые с целью получения представительной выборки ассоциированных с дикими и культурными злаками (пшеница, рожь, овес, просо, кукуруза, сорго и др.) штаммов азоспирилл (Федорова и др., 1985; Позднякова и др., 1988), позволили заложить основу уникального собрания представителей изучаемого бактериального таксона (см. рисунок), вошедшего в коллекцию непатогенных микроорганизмов ИБФРМ РАН.

Ключевыми характеристиками азоспирилл на первых этапах выделения являлись: рост колоний на среде с конго красным (Saceres, 1982) и на картофельном агаре (Tarrand et al., 1978), а также микроскопирование и окраска по Граму. Поскольку основными интересующими признаками выделяемых бактерий были фиксация атмосферного азота и стимуляция роста растений, осуществлялся скрининг изолятов на нитрогеназную и ИУК-продуцирующую активность.

С оригинальными штаммами азоспирилл проводились исследования таксономической направленности. Помимо межвидовой дифференциации с применением методов, основанных на ДНК-ДНК-гибридизации, оценивали внутривидовые различия посредством двух вариантов геномной дактилоскопии – RFLP и AFLP (Позднякова и др., 1988; Nikiforov et al., 1994). Изучали плазмидный состав штаммов (Matveev et al., 1988), тестировали активность эндонуклеаз рестрикции (Никифоров и др., 1994). В течение четырех лет были оптимизированы способы хранения. Многолетние наблюдения показали, что при –70 °С с предварительным замораживанием в жидком азоте штаммы азоспирилл сохраняют высокую жизнеспособность и основные дифференциальные свойства.

В 2014 г. коллекция непатогенных микроорганизмов была преобразована в Коллекцию ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН ([www.collection.ibppm.ru](http://www.collection.ibppm.ru); <http://>

[skp-rf.ru](http://skp-rf.ru)). Она заявлена как специализированная научная коллекция, ориентированная на собрание и поддержание непатогенных бактерий, выделенных в основном из корневой зоны растений. Входит под номером 975 в WFCC и зарегистрирована во Всемирном центре данных о микроорганизмах (World Data Centre for Microorganisms, WDCM), № 1021.

В настоящее время каталог коллекции ([www.collection.ibppm.ru](http://www.collection.ibppm.ru)) насчитывает около 500 культур ризосферных бактерий, относящихся к 28 родам: *Acidovorax*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Aquaspirillum*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Brevundimonas*, *Comamonas*, *Ensifer* (*Sinorhizobium*), *Enterobacter*, *Herbaspirillum*, *Kocuria*, *Micrococcus*, *Moraxella*, *Mycobacterium*, *Nitrospirillum*, *Niveispirillum*, *Nocardioides*, *Ochrobactrum*, *Paenibacillus*, *Pectobacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Rhodococcus*, *Stenotrophomonas*, *Xanthomonas*. Среди них бактерии, изолированные из ризосферы и ризопланы различных диких и культурных растений, штаммы-эндофиты, штаммы, ассоциированные с водными растениями (макрофитами), и др.

Бактерии рода *Azospirillum* составляют примерно половину фонда коллекции. Помимо оригинальных изолятов, выделенных в Саратовской области, присутствуют штаммы различного географического происхождения (из Бразилии, Индии, Сенегала, США, Эквадора и др.), полученные от авторов или из других коллекций. Кроме того, поддерживаются практически все из доступных в общественных депозитариях типовые штаммы известных видов азоспирилл. Ряд коллекционных культур предположительно могут быть отнесены к новым видам этого рода (Голубев и др., 2018). Таким образом, собрание азоспирилл в Коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН весьма представительно. Для сравнения: в DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, [www.dsmz.de](http://www.dsmz.de)) общий фонд бактерий рода *Azospirillum* составляет 27 штаммов, из которых 6 типовых; в BCCM/LMG (Belgian Co-ordinated Collections of Micro-organisms/Laboratory of Microbiology, Faculty of Sciences of Ghent University, [bccm.belspo.be](http://bccm.belspo.be)) – 37 и 10, в JCM (Japan Collection of Microorganisms, [jcm.brc.riken.jp](http://jcm.brc.riken.jp)) – 13 и 5, в ATCC (American Type Culture Collection, [www.lgcstandards-atcc.org](http://www.lgcstandards-atcc.org)) – 14 и 3 соответственно.

## **Azospirillum – характеристика рода**

Впервые этот микроорганизм был выделен М. Бейеринком в 1923 г. и описан как «азотфиксирующая спирилла», но автор не смог подтвердить свойство микроорганизма фиксировать азот в чистой культуре и назвал его *Spirillum lipoferum* (Beijerinck, 1925). Род *Azospirillum* был перераскрыт и описан Tarrand et al. (1978), а широко известен стал благодаря научному энтузиазму и компетентности Дж. Доберейнера, внесшей существенный вклад в фундаментальные и прикладные исследования азоспирилл (Döbereiner, Day, 1976; Hartmann, Baldani, 2006).

Систематика рода *Azospirillum*, принадлежащего семейству *Rhodospirillaceae* порядка *Rhodospirillales* класса *α-Proteobacteria*, весьма динамично развивается. Если с момента описания двух первых видов *A. lipoferum* и *A. brasilense* (Tarrand et al., 1978) и до конца XX в. было сообщено об открытии лишь еще четырех видов: *A. amazonense* (Magalhaes et al., 1983), *A. halopraeferens* (Reinhold et al., 1987), *A. irakense* (Khammas et al., 1989) и *A. largimobile* (Dekhil et al., 1997), то начиная с 2000 г. таковых описано уже 16, с валидно опубликованными названиями: *A. doebereineriae* (Eckert et al., 2001), *A. oryzae* (Xie, Yokota, 2005), *A. melinis* (Peng et al., 2006), *A. canadense* (Mehnaz et al., 2007a), *A. zeaе* (Mehnaz et al., 2007b), *A. rugosum* (Young et al., 2008), *A. picis* (Lin et al., 2009), *A. thiophilum* (Lavrinenko et al., 2010), *A. formosense* (Lin et al., 2012), *A. humicireducens* (Zhou et al., 2013), *A. fermentarium* (Lin et al., 2013), *A. soli* (Lin et al., 2015), *A. agricola* (Lin et al., 2016), *A. ramasamyi* (Anandham et al., 2019), *A. griseum* (Yang et al., 2019) и *A. palustre* (Tikhonova et al., 2019). Вместе с тем в 2014 г. вид *A. irakense* был реклассифицирован в *Niveispirillum irakense* comb. nov., а вид *A. amazonense* – в *Nitrospirillum amazonense* gen. nov., sp. nov. (Lin et al., 2014). Таким образом, на момент написания этой статьи род *Azospirillum* включает 20 валидированных видов. Важно отметить, что членами рода признают еще два вида – *A. himalayense* (Tyagi, Singh, 2014) и *A. palatum* (Zhou et al., 2009), наименования которых не были официально опубликованы в соответствии с правилами Международного кодекса номенклатуры бактерий.

С началом эпохи геномного секвенирования на первый план вышла разработка надежных критериев для сравнительной оценки геномов бактерий и архей в целях таксономии и систематики. Недавно для группы бактерий рода *Azospirillum*, чьи геномы представлены в базе данных GenBank, получены первые результаты применения набора филогенетических тестов в рамках развиваемой геномной таксономии микробов (Щеголев, 2018). Автором установлена зависимость оценки систематического положения штаммов от типа используемых полногеномных данных, относящихся к базовой или базовой и подвижной составляющим пангенома. При этом отмечено, что единой системы отнесения изолятов к тому или иному виду пока не существует. До тех пор пока геномные базы данных не наполнены в необходимой степени качественным материалом, в таксономии и систематике прокариот наиболее корректным остается «полифазный подход», основанный на комбинации фенотипических, хемотаксономических и генотипических характеристик.

Азоспирилла, выбранная в качестве объекта исследований на заре становления института, оказалась прекрасной моделью для изучения явления растительно-микробной ассоциативности. В настоящее время это одна из признанных во всем мире и широко изучаемых так называемых ростстимулирующих ризобактерий (plant growth promoting rhizobacteria – PGPR) (Fukami et al., 2018). Такие микроорганизмы играют важную роль в адаптации растения к внешним воздействиям. При этом нередко образуется единая растительно-микробная ассоциация (ассоциативный симбиоз) с новыми свойствами, детерминированными положительным взаимодействием партнеров.

Для азоспирилл характерно чрезвычайное разнообразие заселяемых видов растений, что говорит о многочисленности экологических стратегий, реализуемых этими бактериями, а также об их широких адаптационных возможностях (Bashan et al., 2004; Baldani et al., 2014; Pereg et al., 2016). Последние осуществляются благодаря таким способностям микроорганизмов, как фиксация атмосферного азота, солюбилизация фосфатов, продукция экзополисахаридов, лектинов, фитогормонов, сидерофоров, поли-β-гидроксibuтирата и пр. Есть данные, указывающие на то, что азоспириллы участвуют в формировании у растений-партнеров так называемой индуцированной системной устойчивости (induced systemic resistance – ISR) в условиях биотического стресса, а также индуцированной системной толерантности (induced systemic tolerance – IST) в условиях абиотического стресса (Fukami et al., 2018).

Большинство видов азоспирилл выделено из ризосферы сухопутных растений. Из водных биотопов изолированы пока лишь три вида – *A. largimobile* (Dekhil et al., 1997), *A. thiophilum* (Lavrinenko et al., 2010) и *A. griseum* (Yang et al., 2019). Секвенирование генома *Azospirillum* показало, что бактерия перешла от водного существования к наземному около 400 млн лет назад – в то же самое время, когда появились на суше сосудистые растения (Wisniewski-Dyé et al., 2011). Почти половина генома *Azospirillum* была приобретена в результате горизонтального переноса генов от других наземных бактерий. Большая часть горизонтально приобретенных генов кодирует функции, имеющие решающее значение для адаптации.

Обладание механизмами фитостимуляции делает азоспириллу одним из лучших инокулянтов, успешно применяемых в разных странах при создании коммерческих биопрепаратов для повышения урожайности различных сельскохозяйственных культур: Azo-Green™, Zea-Nit™, Graminante™, BioPower® и др. (Mehnaz, 2015).

## **Основные результаты исследования азоспирилл в ИБФРМ РАН**

В ИБФРМ РАН использование штаммов азоспирилл в качестве модельного объекта было сосредоточено в основном на исследовании структур, вовлеченных в образование ассоциативного симбиоза и/или имеющих важное таксономическое значение. В первую очередь это внеклеточные полисахаридсодержащие комплексы, играющие весьма важную и разнообразную роль в формировании и

успешном функционировании растительно-микробных ассоциаций. Установлено, что азоспириллы содержат в капсульном материале и продуцируют в окружающую среду сложные высокоагрегированные соединения из полисахаридов (ПС), липидов и белков, а также свободные ПС с молекулярной массой до 20 кДа (Konnova et al., 1994). Выявлено, что капсульные ПС-содержащие компоненты азоспирилл принимают участие в адсорбции бактерий на корнях растений. Впервые показана их способность индуцировать деформации корневых волосков пшеницы (Yegorenkova et al., 2001). Получена приоритетная информация о первичной структуре повторяющихся звеньев ПС из поверхностных липополисахаридов (ЛПС) и капсульных ПС более 40 штаммов азоспирилл различного происхождения (Fedonenko et al., 2013; Федоненко и др., 2015). Для ряда штаммов, изолированных на разных континентах из корневой системы разнообразных растений, показано явление молекулярной мимикрии гликополимеров поверхности бактериальных клеток, обусловленное присутствием идентичных или близких по структуре повторяющихся звеньев в О-специфическом ПС (О-ПС). Резонно предположить, что мимикрия может быть связана с реализацией в процессе формирования ассоциации с растениями определенных стратегий, возможно, обусловленных наличием нескольких механизмов взаимодействия, например эндо- и эктосимбиоза (Коннова и др., 2008; Федоненко и др., 2015).

Для исследования поверхностных бактериальных структур хорошие возможности предоставляют методы иммунохимии, позволяющие на основе изучения деталей строения поверхностных антигенов азоспирилл выяснить, как в целом организована поверхность бактерий, функционирующих в ризосфере растений. ЛПС является мажорным антигеном бактериальной поверхности азоспирилл, в связи с чем строение его О-ПС определяет иммунохимическую специфичность микроорганизмов (Матора и др., 2005). С учетом иммунохимических особенностей углеводных антигенов бактерий рода *Azospirillum* создана биотест-система их серологической идентификации (Vogatyrev et al., 1992).

На примере азоспирилл описан принципиально новый характер микробной R-S-диссоциации, обусловленный перераспределением вкладов двух разных (полноценных) О-ПС в архитектуру клеточной поверхности бактерий в зависимости от возраста культур (Матора и др., 2005). Выделены и исследованы углеводные фрагменты гликозилированного флагеллина полярного жгутика типового штамма *A. brasilense* Sp7, определено их химическое строение (Belyakov et al., 2012). Обнаружена их иммунохимическая идентичность одному из двух О-ПС соматического антигена данного штамма. С учетом полученных результатов, свидетельствующих об идентичности антигенных детерминант в составе капсульных ПС, экзополисахаридов и ЛПС азоспирилл, можно предположить наличие некоего общего пути (либо нескольких перекрещивающихся путей) биосинтеза углеводных поверхностных структур у бактерий рода *Azospirillum*.

Впервые предложен вариант твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) микроосадков почвенных су-

спензий с использованием антител на ЛПС азоспирилл, позволяющий проводить выявление соматического бактериального антигена в почве. На основе оптимизированного варианта ИФА исследована динамика наличия *in situ* соматического антигена интродуцированных в почву ассоциативных бактерий *A. brasilense* (Широков и др., 2015).

Видное место в развитии методологии иммунохимических исследований в ИБФРМ РАН занимает изучение уникальных физико-химических и биохимических свойств наночастиц золота и их биокопьюгатов. С использованием коллоидного золота в качестве носителя и адьюванта и метода фагового дисплея развиты процедуры получения антител к разнообразным антигенам и гаптенам (Матора и др., 2005; Dykman et al., 2010). Получены копьюгаты золотых и золото-серебряных наночастиц с антителами на флагеллин, ЛПС и обладающие родовой специфичностью на поверхностные белковые детерминанты типового штамма *A. brasilense* Sp7. Электронно-микроскопический анализ с использованием меченных металлическими наночастицами антител позволил обнаружить в составе клеточной поверхности *A. brasilense* Sp245 детерминанты флагеллина полярного жгутика, исходно экранированные у данных бактерий от окружающей среды ЛПС чехлом (Широков и др., 2017).

Существенные научные знания привнесены в направление генетики подвижности, биологии плазмид и организации и динамики генома азоспирилл (Katsy, 2011, 2014). Выявлен новый вид социальной подвижности – распространение в полужидкой среде с образованием микроколоний. Именно такое распространение имеет определяющее значение при заселении азоспириллами корней пшеницы, в то время как доминирующим способом социальной подвижности в лабораторных условиях является роение (Шелудько и др., 2010). Показано, что на социальное поведение бактерий оказывают большое влияние как внешние факторы (присутствие определенных растительных лектинов, экссудатов растений и др.), так и спонтанные и индуцированные изменения в геноме, в частности в структуре мегаплазмид. Последние сопровождаются фенотипическими вариациями в социальной подвижности азоспирилл (роение → ускоренное роение; роение → распространение с образованием микроколоний; распространение с образованием микроколоний → ускоренное роение) и могут приводить к изменениям в формировании биопленок и на первых этапах колонизации корней растений (Katsy, Prilipov, 2009; Schelud'ko et al., 2009).

Впервые описаны инсерционные элементы, обуславливающие пластичность мегаплазмид *A. brasilense*. Получена информация о первичной структуре и функциях ряда таких плазмид (Katsy, Prilipov, 2009). Инсерционные элементы IS*Azba1* и IS*Azba3*, опосредующие слияние реидентной плазмиды *A. brasilense* Sp245 с чужеродной ДНК, способствуют обогащению генома азоспирилл новым материалом. Динамика генома *A. brasilense* оказывает существенное влияние на строение бактериальных ЛПС азоспирилл и их антигенные свойства, а также на устойчивость этих бактерий к ионам тяжелых металлов и нитритам (Кацы, Петрова, 2015). Идентифицированы

гены азоспирилл, регулирующие продукцию ЛПС, жгутиков, подвижность и денитрификацию. Создана коллекция мутантов *A. brasilense*, рекомбинантных плазмид и штаммов *Escherichia coli*, содержащих клонированные гены азоспирилл (Ковтунов и др., 2013).

Еще один компонент клеточной поверхности азоспирилл – это лектины, углеводсвязывающие белки, являющиеся важными структурами в системе «узнавания» и установления взаимного партнерства на начальных этапах формирования ассоциативных взаимоотношений «бактерия–растение». Исследования лектинов азоспирилл в ИБФРМ РАН начались во второй половине 1980-х гг. (Никитина и др., 2005). Впервые на поверхности азоспирилл, различающихся по источникам и регионам выделения (30 штаммов), обнаружены лектины, имеющие штаммовые различия по специфичности к углеводам. Установлено, что лектины распределены равномерно на наружной мембране азоспирилл и не принадлежат каким-либо морфологическим структурам типа пилей, жгутиков (Карпунина и др., 1995). Выявлена зависимость лектиновой активности бактерий от условий культивирования. Условия, неблагоприятные для роста культуры, стимулировали активность этих молекул, и наоборот. Лектины азоспирилл, связанные с внешней мембраной, играют существенную роль в адгезии бактерий к корням проростков пшеницы. Обнаружена их способность взаимодействовать с экзокомпонентами, компонентами мембранной фракции и лектинами корней проростков растений (Никитина и др., 1996). Методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии показана локализация меченных тритием лектинов азоспирилл исключительно на плазматической мембране клеток корней проростков пшеницы. Выявлен целый спектр ответных биохимических реакций, вызываемых лектинами на начальных этапах взаимодействия с корнями (Alen'kina et al., 2014).

Бактериальные лектины оказывали воздействие на прорастание семян высших растений, в зависимости от дозы подавляя или стимулируя его. Установлено регуляторное влияние лектинов азоспирилл в отношении ряда собственных и растительных гидролитических ферментов (Alen'kina et al., 2006). На основании обнаруженного взаимодействия полисахаридсодержащих комплексов азоспирилл с собственными лектинами, а также с поверхностно локализованными агглютинирующими белками других почвенных микроорганизмов (бацилл и ризобий) можно судить об участии этих внеклеточных гликополимеров в процессах агрегации азоспирилл и в межбактериальных контактах в ходе образования почвенного ценоза.

Впервые для азоспирилл описана способность восстанавливать золото (III) ( $AuCl_4^-$ ) и селен (IV) ( $SeO_3^{2-}$ ) до элементарного состояния (Купряшина и др., 2014; Tugarova et al., 2014a, b) с образованием наночастиц. Предложена простая схема бактериального синтеза селеновых наночастиц с экстраклеточной локализацией (Tugarova et al., 2018).

Различные аспекты существования азоспирилл активно изучаются с использованием современных инструментальных методов, в том числе различных вариантов спектроскопии: мёссбауэровской, ИК-Фурье и комбинационного рассеяния (Kamnev et al., 2001, 2018; Kam-

nev, Tugarova, 2017). На примере глутаминсинтетазы, выделенной из клеток *A. brasilense* Sp245, была показана возможность применения ядерной гамма-резонансной спектроскопии (на ядрах  $^{57}Co$ ) для изучения структурной организации сайтов связывания катионов металлов в активных центрах ферментов (Kamnev, Tugarova, 2017). Впервые для азоспирилл изучены ассимиляция железа и особенности состава и структуры железосодержащих клеточных компонентов (Kovács et al., 2016), а также взаимодействие и метаболические превращения ионов кобальта культурами *A. brasilense* (Kamnev, Tugarova, 2017).

Наиболее выраженным откликом на негативные воздействия у азоспирилл является синтез поли- $\beta$ -гидроксibuтирата (ПГБ), особенности и различия накопления которого выявлены у штаммов *A. brasilense* Sp7 (эпифит) и Sp245 (эндофит) в реакции на стресс, вызванный тяжелыми металлами (Kamnev et al., 2018). Показано сниженное содержание ПГБ в биопленке (6 сут), образуемой мутантом *A. brasilense* Sp245.1610, лишенным жгутиков, по сравнению со штаммом дикого типа Sp245, что может влиять на формирование и стабильность биопленок (Tugarova et al., 2017).

Известно, что в неблагоприятных условиях обитания преимущества имеют растения, у которых в состав ризосферных ассоциаций входят микроорганизмы, выполняющие широкий комплекс функций, включая питание растений, их устойчивость к абиотическим стрессам, биоконтроль (защита от патогенов), освобождение почв от загрязнителей (Тихонович, Проворов, 2009). В последнем случае это осуществляется за счет микроорганизмов – деструкторов поллютантов. Азоспириллы, обладая практически всеми вышеперечисленными свойствами, являются типичными представителями таких защитных ассоциаций. Скрининг штаммов из Коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН позволил выявить нефтеокисляющую активность у представителей *Azospirillum* (Муратова и др., 2005). На модели *A. brasilense* SR80–пшеница показано, что нефть не препятствует проявлению ростстимулирующей активности бактерии и не влияет на продукцию ею ИУК. Штамм проявлял хемотаксис по отношению не только к корневым экссудатам пшеницы, но и к сырой нефти (Муратова и др., 2005). Он был устойчив также к токсическому действию глифосата, показывая в его присутствии стабильно высокий уровень синтеза ауксина (Крючкова и др., 2005). На основе полученных результатов разработан способ фиторемедиации загрязненного углеводородами грунта с использованием смеси бобовых и злаковых растений и *A. brasilense* SR80 в качестве инокулянта (Патент RU 2403102). Существенный интерес для экологической биотехнологии представляет штамм *A. brasilense* Sp245, способный в ассоциации с корнями проростков пшеницы «Саратовская 29» трансформировать неорганические формы мышьяка (арсенит в арсенат), снижая токсичность этого металлоида (Lyubun et al., 2006).

На основе штамма *A. zeaе* из Коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН сотрудниками группы компаний «Бионоватик» разработан и производится биопрепарат Organit N, направленный на улучшение азотного

питания растений (bionovatic.ru). Согласно спецификации производителя, препарат эффективен на зерновых и зернобобовых культурах, кукурузе, сахарной свекле.

Высокая эффективность искусственных растительно-микробных ассоциаций, создаваемых *in vitro* с участием азоспирилл, показана в развитии технологий микроклонального размножения растений с целью повышения качества посадочного материала сельскохозяйственных культур и сохранения редких видов растений – источников ценных биологически активных соединений (Tkachenko et al., 2015).

### Заключение

Несмотря на довольно продолжительный период изучения бактерий рода *Azospirillum*, интерес к ним мирового научного сообщества не ослабевает; количество посвященных им публикаций в течение последнего десятилетия неуклонно растет, достигнув 250 статей в год (по данным www.scholar.google.com). Полученные знания служат базой для расширения исследований разнообразных бактерий, образующих ассоциации и симбиозы с растениями. Именно в этом направлении развивается Коллекция ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН в настоящее время, и в этом смысле роль подобных специализированных коллекций трудно переоценить. В результате участия ИБФРМ РАН в российско-европейском проекте 7-й Рамочной программы Европейского Союза «Банки ризосферных микроорганизмов» (Banking Rhizosphere Micro-Organisms) BRIO No. 266106 (2011–2014 гг.) часть штаммов Коллекции включена в паневропейскую базу данных ризосферных микроорганизмов, предназначенную для поддержки как научных исследований микробиома ризосферы, так и практической биотехнологии (Declerk et al., 2015).

Следует отметить, что описанные выше результаты получены в ИБФРМ РАН с использованием современных методов, в том числе в рамках российских и международных проектов (РНФ, РФФИ, грантов Президента России, государственных программ, МНТЦ, INTAS, НАТО, FP-7 и др.). Эти данные легли в основу более 80 защищенных кандидатских и докторских диссертаций. Опубликовано более 600 работ в российских и международных научных изданиях. Создана научная школа под руководством профессора, д.б.н., заслуженного деятеля науки РФ В.В. Игнатова, неоднократно поддержанная грантами Президента РФ. Ряд изобретений защищены патентами РФ. Штаммы – стимуляторы роста растений и деструкторы поллютантов – в последнее время стали объектом пристального интереса со стороны отечественного малого бизнеса.

Таким образом, на примере Коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН весьма отчетливо видно значение подобных специальных собраний для фундаментальных и прикладных аспектов биологической науки.

### Список литературы / References

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. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2018;18(1):52-59. DOI 10.18500/1816-9775-2018-18-1-52-59.

[Golubev S.N., Dubrovskaya E.V., Turkovskaya O.V. Rhizosphere microorganism collection of IBPPM RAS: revision of *Azospirillum* strains based on 16S rRNA gene sequence analysis. Izvestiya Saratovskogo Universiteta = Proceedings of the Saratov State University, new series, Ser. Chemistry–Biology–Ecology. 2018;18(1):52-59. DOI 10.18500/1816-9775-2018-18-1-52-59. (in Russian)]

Ившина И.В. Состояние и проблемы развития специализированных центров микробиологических ресурсов в России. Микробиология. 2012;81(5):551-560.

[Ivshina I.B. Current situation and challenges of specialized microbial resource centres in Russia. Microbiology (Moscow). 2012; 81(5):509-516. DOI 10.1134/S0026261712050098.]

Калакуцкий Л.В., Озерская С.М. Биологические ресурсные центры: современное состояние в России и мире, проблемы организации, перспективы развития. Вестн. биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. 2011;7(1): 28-40.

[Kalakutskiy L.V., Ozerskaya S.M. Biological resource centres: current status in Russia and the world, problems of organization, development prospects. Vestnik Biotekhnologii i Fiziko-Khimicheskoy Biologii imeni Yu.A. Ovchinnikova = Yu.A. Ovchinnikov Bulletin of Biotechnology and Physical and Chemical Biology. 2011;7(1): 28-40. (in Russian)]

Калакуцкий Л.В., Озерская С.М., Евтушенко Л.И., Мазанов А.Л. Российские коллекции микроорганизмов. Прикл. биохимия и микробиология. 1996;32(1):144-154.

[Kalakutskii L.V., Ozerskaya S.M., Evtushenko L.I., Mazanov A.L. Russian collections of microorganisms. Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya = Applied Biochemistry and Microbiology. 1996; 32(1):133-143. (in Russian)]

Карпунина Л.В., Вишневецкая О.А., Богатырёв В.А., Никитина В.Е., Итальянская Ю.В. Определение локализации лектинов, агглютининов почвенных азотфиксирующих бактерий. Микробиология. 1995;64(4):453-457.

[Karpunina L.V., Vishneveckaya O.A., Bogatyrev V.A., Nikitina V.E., Ital'yanskaya Yu.V. Determination of lectin and agglutinin localization in soil nitrogen-fixing bacteria. Mikrobiologiya = Microbiology (Moscow). 1995;64(4):453-457. (in Russian)]

Кацы Е.И., Петрова Л.П. Геномные перестройки у *Azospirillum brasilense* Sp7 с участием плазмиды pRhico и профара ФAb-Cd. Генетика. 2015;51(12):1351-1358. DOI 10.7868/S0016675815110090.

[Katsy E.I., Petrova L.P. Genome rearrangements in *Azospirillum brasilense* Sp7 with the involvement of the plasmid pRhico and the prophage ФAb-Cd. Russ. J. Genet. 2015;51(12):1165-1171. DOI 10.1134/S1022795415110095.]

Ковтунов Е.А., Петрова Л.П., Шелудько А.В., Кацы Е.И. Инсерция транспозона в хромосомную копию гена *flhB* сопровождается дефектами в образовании полярного и латеральных жгутиков у бактерий *Azospirillum brasilense* Sp245. Генетика. 2013;49(8): 1013-1016. DOI 10.7868/S0016675813080067.

[Kovtunov E.A., Petrova L.P., Shelud'ko A.V., Katsy E.I. Transposon insertion into a chromosomal copy of *flhB* gene is concurrent with defects in the formation of polar and lateral flagella in bacterium *Azospirillum brasilense* Sp245. Russ. J. Genet. 2013;49(8): 881-884. DOI 10.1134/S1022795413080061.]

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 бактерий рода *Azospirillum*. Микробиология. 2008;77(3):350-357.

[Konnova O.N., Boiko A.S., Burygin G.L., Fedorenko Yu.P., Matora L.Yu., Konnova S.A., Ignatov V.V. Chemical and serological studies of liposaccharides of bacteria of the genus *Azospiril-*

- lum*. Microbiology (Moscow). 2008;77(3):305-312. DOI 10.1134/S0026261708030090.]
- Крючкова Е.В., Бuryгин Г.Л., Макаров О.Е., Фёдоров Е.Е. Рост и продукция ауксина у ризосферных бактерий рода *Azospirillum* в присутствии глифосата. В: Турковская О.В. (ред.). Стратегия взаимодействия микроорганизмов с окружающей средой. Саратов, 2005;140-147.  
[Kryuchkova E.V., Burygin G.L., Makarov O.E., Fedorov E.E. Growth and production of auxin in rhizosphere bacteria of the genus *Azospirillum* with the presence of glyphosate. In: Turkovskaya O.V. (Ed.). The Strategy of Interaction of Microorganisms with the Environment. Saratov, 2005;140-147. (in Russian)]
- Купряшина М.А., Ветчинкина Е.П., Буров А.М., Пономарёва Е.Г., Никитина В.Е. Биосинтез золотых наночастиц бактериями *Azospirillum brasilense*. Микробиология. 2014;83(1):41-48. DOI 10.7868/S0026365614010078.  
[Kupryashina M.A., Vetchinkina E.P., Burov A.M., Ponomareva E.G., Nikitina V.E. Biosynthesis of gold nanoparticles by *Azospirillum brasilense*. Microbiology (Moscow). 2013;82(6):833-840. DOI 10.1134/S002626171401007X.]
- Матора Л.Ю., Богатырев В.А., Дыкман Л.А., Щеголев С.Ю. Иммунохимическая идентификация азоспирилл и исследование их антигенных структур. В: Игнатов В.В. (ред.). Молекулярные основы взаимоотношений ассоциированных микроорганизмов с растениями. М.: Наука, 2005;209-237.  
[Matora L.Yu., Bogatyrev V.A., Dykman L.A., Shchyogolev S.Yu. Immunochemical identification of azospirilla and studies of their antigenic structures: In: Ignatov V.V. (Ed.). Molecular Bases of the Relationships between Associative Microorganisms and Plants. Moscow: Nauka Publ., 2005;209-237. (in Russian)]
- 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;74(2):248-254.  
[Muratova A.Yu., Turkovskaya O.V., Antonyuk L.P., Makarov O.E., Pozdnyakova L.I., Ignatov V.V. Oil-oxidizing potential of associative rhizobacteria of the genus *Azospirillum*. Microbiology (Moscow). 2005;74(2):210-215. DOI 10.1007/s11021-005-0053-4.]
- Никитина В.Е., Аленькина С.А., Пономарёва Е.Г., Савенкова Н.Н. Изучение роли лектинов клеточной поверхности азоспирилл во взаимодействии с корнями пшеницы. Микробиология. 1996;65(2):165-170.  
[Nikitina V.E., Alen'kina S.A., Ponomareva E.G., Savenkova N.N. Role of lectins of the cell surface of azospirilla in association with wheat roots. Microbiology (Moscow). 1996;65(2):144-148.]
- Никитина В.Е., Пономарева Е.Г., Аленькина С.А. Лектины клеточной поверхности азоспирилл и их роль в ассоциативных взаимоотношениях с растениями. В: Игнатов В.В. (ред.). Молекулярные основы взаимоотношений ассоциированных микроорганизмов с растениями. М.: Наука, 2005;70-97.  
[Nikitina V.E., Ponomareva E.G., Alen'kina S.A. *Azospirillum* cell surface lectins and their role in associative plant-bacterial interactions. In: Ignatov V.V. (Ed.). Molecular Bases of the Relationships between Associative Microorganisms and Plants. Moscow: Nauka Publ., 2005;70-97. (in Russian)]
- Никифоров В.В., Козель Е.А., Шнейерсон В.В., Позднякова Л.И., Федорова Л.С. Рестриктазы бактерий рода *Azospirillum*, выделенных из злаков Саратовской области. Молекуляр. генетика, микробиология и вирусология. 1994;4:12.  
[Nikiforov V.V., Kozel E.A., Shneerson V.V., Pozdnyakova L.I., Fedorova L.S. Restriction endonucleases of the genus *Azospirillum* isolated from cereals of the Saratov region. Molekulyarnaya Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya = Molecular Genetics, Microbiology, and Virology. 1994;4:12. (in Russian)]
- Патент RU 2403102 C1, МПК В09С 1/10. Способ фиторемедиации грунта, загрязненного углеводородами (варианты). Авторы: А.Ю. Муратова, А.Д. Бондаренкова, С.Н. Голубев, Л.В. Панченко, О.В. Турковская. Заяв. 15.05.2009. Опубл. 10.11.2010. Бюл. № 31.  
[Patent RU 2403102 C1, IPC B09C 1/10. Method of Phytoremediation of Soil Contaminated with Hydrocarbons (versions). Inventors: A.Yu. Muratova, A.D. Bondarenkova, S.N. Golubev, L.V. Panchenko, O.V. Turkovskaya. Appl. 15.05.2009. Publ. 10.11.2010. Bull. No. 31. (in Russian)]
- 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;57(2):275-278.  
[Pozdnyakova L.I., Kanevskaya S.V., Levanova G.F., Barysheva N.N., Pilipenko T.Yu., Bogatyrev V.A., Fedorova L.S. Taxonomic studies of *Azospirillum* isolated from cereals in the Saratov region. Mikrobiologiya = Microbiology (Moscow). 1988;57(2):275-278. (in Russian)]
- Распоряжение Правительства РФ от 18 июля 2013 г. № 1247-р «Об утверждении плана мероприятий («дорожной карты») «Развитие биотехнологий и геномной инженерии»». <https://rulings.ru/government/Rasporyazhenie-Pravitelstva-RF-ot-18.07.2013-N-1247-r/> [Decree of the Government of the Russian Federation of July 18, 2013 No. 1247-r "On approval of the action plan ("road map") "Development of biotechnologies and genetic engineering". Available at: <https://rulings.ru/government/Rasporyazhenie-Pravitelstva-RF-ot-18.07.2013-N-1247-r/> (in Russian)]
- Рекомендации «круглого стола» на тему «О совершенствовании законодательного обеспечения сохранения биологических коллекций для развития биотехнологической отрасли Российской Федерации». В: Вопросы правового обеспечения научно-технической и инновационной деятельности: Информ.-аналит. сб. по материалам выездного расширенного заседания и «круглого стола». М.: Изд. Гос. Думы, 2011;176-180.  
[Recommendations of the "round table" on the topic "On improving legislative support for the conservation of biological collections for the development of the biotechnological industry of the Russian Federation". In: Issues of Legal Support for Scientific, Technical and Innovative Activities: an informational and analytical compilation based on materials from an extended field session and a round table. Moscow: Publication of the State Duma, 2011;176-180. (in Russian)]
- Тихонович И.А., Проворов Н.А. Симбиозы растений и микроорганизмов: молекулярная генетика агросистем будущего. СПб., 2009.  
[Tikhonovich I.A., Provorov N.A. Symbiosis of Plants and Microorganisms: The Molecular Genetics of the Agrosystems of the Future. St. Petersburg, 2009. (in Russian)]
- Федоненко Ю.П., Сигида Е.Н., Игнатов В.В., Коннова С.А. Структура и серология O-антигенов азотфиксирующих ризобактерий рода *Azospirillum*. Изв. АН. Сер. хим. 2015;64(5):1024-1031.  
[Fedonenko Yu.P., Sigida E.N., Ignatov V.V., Konnova S.A. Structure and serology of O-antigens of nitrogen-fixing rhizobacteria of the genus *Azospirillum*. Russ. Chem. Bull. 2015;64(5):1024-1031. DOI 10.1007/s11172-015-0971-x.]
- Федорова Л.С., Позднякова Л.И., Каневская С.В. Выделение азоспирилл из культурных и дикорастущих злаков Саратовской области. Микробиология. 1985;54(4):684-685.  
[Fedorova L.S., Pozdnyakova L.I., Kanevskaya S.V. Isolation of *Azospirillum* from cultural and wild cereals. Mikrobiologiya = Microbiology (Moscow). 1985;54(4):684-685. (in Russian)]
- Шелудько А.В., Широков А.А., Соколова М.К., Соколов О.И., Петрова Л.П., Матора Л.Ю., Кацы Е.И. Колонизация корней пшеницы бактериями *Azospirillum brasilense* с различной подвижностью. Микробиология. 2010;79(5):696-704.  
[Shelud'ko A.V., Shirokov A.A., Sokolova M.K., Sokolov O.I., Petrova L.P., Matora L.Yu., Katsy E.I. Wheat root colonization by *Azo-*



- spirillum brasilense* strains with different motility. *Microbiology (Moscow)*. 2010;79(5):688-695. DOI 10.1134/S0026261710050140.]
- Широков А.А., Буданова А.А., Буров А.М., Хлебцов Б.Н., Красов А.И., Щеголев С.Ю., Матора Л.Ю. Иммуноэлектронно-микроскопическое исследование поверхности клеток штаммов *Azospirillum brasilense*. *Микробиология*. 2017;86(4):476-482. DOI 10.7868/S0026365617040140.
- [Shirokov A.A., Budanova A.A., Burov A.M., Khlebtsov B.N., Krasov A.I., Shchyogolev S.Yu., Matora L.Yu. Immunoelectron microscopy investigation of the cell surface of *Azospirillum brasilense* strains. *Microbiology (Moscow)*. 2017;86(4):487-492. DOI 10.1134/S0026261717040142.]
- Широков А.А., Красов А.И., Селиванов Н.Ю., Бурьгин Г.Л., Щеголев С.Ю., Матора Л.Ю. Иммунохимическое выявление бактерий рода *Azospirillum* в почве с помощью родоспецифичных антител. *Микробиология*. 2015;84(2):244-249. DOI 10.7868/S0026365615020135.
- [Shirokov A.A., Krasov A.I., Selivanov N.Yu., Burygin G.L., Shchegolev S.Yu., Matora L.Yu. Immunochemical detection of azospirilla in soil with genus-specific antibodies. *Microbiology (Moscow)*. 2015;84(2):263-267. DOI 10.1134/S0026261715020137.]
- Щеголев С.Ю. О систематике прокариот: актуальные проблемы и пути выхода из кризиса. *Вестн. биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова*. 2018;14(1):5-14.
- [Shchyogolev S.Yu. On prokaryote taxonomy: topical problems and ways out of the crisis. *Vestnik Biotekhnologii i Fiziko-Khimicheskoy Biologii imeni Yu.A. Ovchinnikova = Yu.A. Ovchinnikov Bulletin of Biotechnology and Physical and Chemical Biology*. 2018; 14(1):5-14. (in Russian)]
- Alen'kina S.A., Bogatyrev V.A., Matora L.Yu., Sokolova M.K., Chernysheva M.P., Trutneva K.A., Nikitina V.E. Signal effects of the lectin from the associative nitrogen-fixing bacterium *Azospirillum brasilense* Sp7 in bacterial-plant root interactions. *Plant Soil*. 2014; 381(1-2):337-349. DOI 10.1007/s11104-014-2125-6.
- Alen'kina S.A., Payusova O.A., Nikitina V.E. Effect of *Azospirillum* lectins on the activities of wheat-root hydrolytic enzymes. *Plant Soil*. 2006;283(1-2):147-151. DOI 10.1007/s11104-005-4890-8.
- Anandham R., Heo J., Krishnamoorthy R., SenthilKumar M., Gopal N.O., Kim S.J., Kwon S.-W. *Azospirillum ramasamyi* sp. nov., a novel diazotrophic bacterium isolated from fermented bovine products. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2019;69(5):1369-1375. DOI 10.1099/ijsem.0.003320.
- Baldani J.I., Videira S.S., Teixeira K.R.S., 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*. In: Rosenberg E., DeLong E.F., Lory S., Stackebrandt E., Thompson F. (Eds.). *The Prokaryotes: Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria*. Fourth Edn. Berlin: Heidelberg, 2014;533-618.
- Bashan Y., Holguin G., de-Bashan L.E. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997–2003). *Can. J. Microbiol.* 2004;50(8):521-577. DOI 10.1139/w04-035.
- Beijerinck M.W. Über ein Spirillum, welches freien Stickstoff binden kann? *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene*. 1925;II(63):353-359.
- Belyakov A.Ye., Burygin G.L., Arbatsky N.P., Shashkov A.S., Selivanov N.Yu., Matora L.Yu., Knirel Yu.A., Shchyogolev S.Yu. Identification of an O-linked repetitive glycan chain of the polar flagellum flagellin of *Azospirillum brasilense* Sp7. *Carbohydr. Res.* 2012; 361:127-132. DOI 10.1016/j.carres.2012.08.019.
- Bogatyrev V.A., Dykman L.A., Matora L.Yu., Schwartsburd B.I. The serotyping of *Azospirillum* spp. by cell-gold immunoblotting. *FEMS Microb. Lett.* 1992;75(2-3):115-118. DOI 10.1111/j.1574-6968.1992.tb05402.x.
- Caceres E.A.R. Improved media for isolation of *Azospirillum* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 1982;44(4):990-991.
- Declerck S., Willems A., van der Heijden M., Varese G., Turkovskaya O., Evtushenko L., Ivshina I., Desmeth Ph. PERN: an EU-Russia initiative for rhizosphere microbial resources. *Trends Biotechnol.* 2015;33(7):377-380. DOI 10.1016/j.tibtech.2015.03.005.
- Dekhil S.B., Cahill M., Stackbrandt E., Sly L.I. Transfer of *Conglomeromonas largomobilis* subs. *largomobilis* to the genus *Azospirillum* as *Azospirillum largomobile* comb. nov., and elevation of *Conglomeromonas largomobilis* subs. *parooensis* to the new type species of *Conglomeromonas*, *Conglomeromonas parooensis* sp. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* 1997;20:72-77. DOI 10.1016/S0723-2020(97)80050-1.
- Döbereiner J., Day J. Associative symbioses in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites. In: Newton W.E., Nyman C.J. (Eds.). *Proceedings of the First International Symposium on Nitrogen Fixation*. Washington, 1976;2:518-538.
- Dykman L.A., Staroverov S.A., Bogatyrev V.A., Shchyogolev S.Yu. Gold nanoparticles as an antigen carrier and an adjuvant. In: Chow P.E. (Ed.). *Gold Nanoparticles: Properties, Characterization and Fabrication*. New York, 2010;2:59-88.
- Eckert B., Weber O.B., Kirchhof G., Halbritter A., Stoffels M., Hartmann A. *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-grass *Miscanthus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2001;51(1):17-26. DOI 10.1099/00207713-51-1-17.
- Fedonenko Yu.P., Burygin G.L., Sigida E.N., Popova I.A., Surkina A.K., Zdrovenko E.L., Konnova S.A. Immunochemical characterization of the capsular polysaccharide from the *Azospirillum irakense* KBC1. *Curr. Microbiol.* 2013;67(2):234-239. DOI 10.1007/s00284-013-0346-1.
- Fukami J., Cerezini P., Hungria M. *Azospirillum*: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. *AMB Express*. 2018;8(1):73. DOI 10.1186/s13568-018-0608-1.
- Hartmann A., Baldani J.I. The genus *Azospirillum*. *Prokaryotes*. 2006; 5:115-140.
- Kamnev A.A., Tarantilis P.A., Antonyuk L.P., Bespalova L.A., Polissiou M.G., Colina M., Gardiner P.H.E., Ignatov V.V. Fourier transform Raman spectroscopic characterisation of cells of the plant-associated soil bacterium *Azospirillum brasilense* Sp7. *J. Mol. Struct.* 2001;563-564:199-207. DOI 10.1016/S0022-2860(00)00877-2.
- Kamnev A.A., Tugarova A.V. Sample treatment in Mössbauer spectroscopy for protein-related analyses: nondestructive possibilities to look inside metal-containing biosystems. *Talanta*. 2017;174:819-837. DOI 10.1016/j.talanta.2017.06.057.
- Kamnev A.A., Tugarova A.V., Dyatlova Yu.A., Tarantilis P.A., Grigoryeva O.P., Fainleib A.M., De Luca S. Methodological effects in Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy: implications for structural analyses of biomacromolecular samples. *Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectrosc.* 2018;193:558-564. DOI 10.1016/j.saa.2017.12.051.
- Katsy E.I. Plasmid plasticity in the plant-associated bacteria of the genus *Azospirillum*. In: Maheshwari D.K. (Ed.). *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Growth Responses*. Berlin, 2011;139-157.
- Katsy E.I. Plasmid rearrangements and changes in cell-surface architecture and social behavior of *Azospirillum brasilense*. In: Katsy E.I. (Ed.). *Plasticity in Plant-Growth-Promoting and Phytopathogenic Bacteria*. New York, 2014;81-97.
- Katsy E.I., Prilipov A.G. Mobile elements of an *Azospirillum brasilense* Sp245 85-MDa plasmid involved in replicon fusions. *Plasmid*. 2009;62(1):22-29. DOI 10.1016/j.plasmid.2009.02.003.
- Khammas K.M., Ageron E., Grimont P.A.D., Kaiser P. *Azospirillum irakense* sp. nov., a new nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. *Res. Microbiol.* 1989;140(9):679-693. DOI 10.1016/0923-2508(89)90199-X.
- 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 interactions. *FEMS Micro-*

- biol. Lett. 1994;118(1-2):93-100. DOI 10.1111/j.1574-6968.1994.tb06809.x.
- Kovács K., Kamnev A.A., Pechoušek J., Tugarova A.V., Kuzmann E., Machala L., Zbořil R., Homonnay Z., Lázár K. Evidence for ferritin as dominant iron-bearing species in the rhizobacterium *Azospirillum brasilense* Sp7 provided by low-temperature/in-field Mössbauer spectroscopy. Anal. Bioanal. Chem. 2016;408(6):1565-1571. DOI 10.1007/s00216-015-9264-3.
- Lavrinenko K., Chernousova E., Gridneva E., Dubinina G., Akimov V., Kuever J., Lysenko A., Grabovich M. *Azospirillum thiophilum* sp. nov., a diazotrophic bacterium isolated from a sulfide spring. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2010;60(12):2832-2837. DOI 10.1099/ijs.0.018853-0.
- 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 agricultural soil. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2015; 65(12):4601-4607. DOI 10.1099/ijssem.0.000618.
- Lin S.-Y., Hameed A., Shen F.-T., Liu Y.-C., Hsu Y.-H., Shahina M., Lai W.-A., Young C.-C. Description of *Niveispirillum fermenti* gen. nov., sp. nov., isolated from a fermentor in Taiwan, transfer of *Azospirillum irakense* (1989) as *Niveispirillum irakense* comb. nov., and reclassification of *Azospirillum amazonense* (1983) as *Nitrospirillum amazonense* gen. nov. Antonie van Leeuwenhoek. 2014; 105(6):1149-1162. DOI 10.1007/s10482-014-0176-6.
- 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. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2016; 66(3):1453-1458. DOI 10.1099/ijssem.0.000904.
- Lin S.-Y., Liu Y.-C., Hameed A., Hsu Y.-H., Lai W.-A., Shen F.-T., Young C.-C. *Azospirillum fermentarium* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from a fermenter. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2013; 63(10):3762-3768. DOI 10.1099/ijs.0.050872-0.
- Lin S.-Y., Shen F.-T., Young L.-S., Zhu Z.-L., Chen W.-M., Young C.-C. *Azospirillum formosense* sp. nov., a diazotroph from agricultural soil. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2012;62(5):1185-1190. DOI 10.1099/ijs.0.030585-0.
- Lin S.-Y., Young C.-C., Hupfer H., Siering C., Arun A.B., Chen W.-M., Lai W.-A., Shen F.-T., Rekha P.D., Yassin A.F. *Azospirillum picis* sp. nov., isolated from discarded tar. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2009;59(4):761-765. DOI 10.1099/ijs.0.65837-0.
- Lyubun Ye.V., Fritzsche A., Chernyshova M.P., Dudel E.G., Fedorov E.E. Arsenic transformation by *Azospirillum brasilense* Sp245 in association with wheat (*Triticum aestivum* L.) roots. Plant Soil. 2006;286(1-2):219-227. DOI 10.1007/s11104-006-9039-x.
- Magalhães F.M.M., Baldani J.I., Souto S.M., Kuykendall J.R., Döbereiner J.A. New acid-tolerant *Azospirillum* species. Ann. Acad. Bras. Cienc. 1983;55:417-430.
- Matveev V.Yu., Sen A.N., Panasenkov V.I. Plasmid content of *Azospirillum* strains from cereals. Folia Microbiol. 1988;33(4):273-276. DOI 10.1007/BF02925620.
- Mehnaz S. *Azospirillum*: a biofertilizer for every crop. In: Arora N.K. (Ed.). Plant Microbes Symbiosis: Applied Facets. New Delhi: Springer, 2015;297-314. DOI 10.1007/978-81-322-2068-8\_15.
- Mehnaz S., Weselowski B., Lazarovits G. *Azospirillum canadense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from corn rhizosphere. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2007a;57(3):620-624. DOI 10.1099/ijs.0.64804-0.
- Mehnaz S., Weselowski B., Lazarovits G. *Azospirillum zae* sp. nov., a diazotrophic bacterium isolated from rhizosphere soil of *Zea mays*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2007b;57(12):2805-2809. DOI 10.1099/ijs.0.65128-0.
- Nikiforov V.V., Fedorova L.S., Pozdnyakova L.I., Zeleneva T.Yu., Golubev S.N., Kamennova E.B., Kovalenko E.P. Study of azospirilla isolated from cereals grown in Saratov region. In: Proc. 1st European Nitrogen Fixation Conference. Szeged, August 28–September 2, 1994. Szeged, 1994;260-264.
- Peng G., Wang H., Zhang G., Hou W., Liu Y., Wang E.T., Tan Z. *Azospirillum melinis* sp. nov., a group of diazotrophs isolated from tropical molasses grass. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2006;56(6):1263-1271. DOI 10.1099/ijs.0.64025-0.
- Pereg L., de-Bashan L.E., Bashan Y. Assessment of affinity and specificity of *Azospirillum* for plants. Plant Soil. 2016;399(1-2):389-414. DOI 10.1007/s11104-015-2778-9.
- Reinhold B., Hurek T., Fendrik I., Pot B., Gillis M., Kertsters K., Thielemans D., De Ley J. *Azospirillum halopraeferans* sp. nov., a nitrogen fixing organism associated with roots of kallar grass [*Leptochloa fusca* (L.) Kunth.]. Int. J. Syst. Bacteriol. 1987;37(1):43-51. DOI 10.1099/00207713-37-1-43.
- Schelud'ko A.V., Makrushin K.V., Tugarova A.V., Krestinenko V.A., Panasenkov V.I., Antonyuk L.P., Katsy E.I. Changes in motility of the rhizobacterium *Azospirillum brasilense* in the presence of plant lectins. Microbiol. Res. 2009;164(2):149-156. DOI 10.1016/j.micres.2006.11.008.
- Tarrand J., Krieg N., Döbereiner J. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group with descriptions of a new genus *Azospirillum* gen. nov. two species, *Azospirillum lipofeu* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. Can. J. Microbiol. 1978;24(8):967-980. DOI 10.1139/m78-160.
- Tikhonova E.N., Grouzdev D.S., Kravchenko I.K. *Azospirillum palustre* sp. nov., a methylophilic nitrogen-fixing species isolated from raised bog. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2019;69(9):2787-2793. DOI 10.1099/ijssem.0.003560.
- Tkachenko O.V., Evseeva N.V., Boikova N.V., Matora L.Yu., Burygin G.L., Lobachev Yu.V., Shchyogolev S.Yu. Improved potato microclonal reproduction with the plant-growth promoting rhizobacteria *Azospirillum*. Agron. Sustain. Dev. 2015;35(3):1167-1174. DOI 10.1007/s13593-015-0304-3.
- Tugarova A., Mamchenkova P., Dyatlova Y., Kamnev A. Biochemical study of selenite bioconversion by *Azospirillum brasilense*. FEBS Open Bio. 2018;8(S1):479-480. DOI 10.1002/2211-5463.12446.
- Tugarova A.V., Burov A.M., Burashnikova M.M., Kamnev A.A. Gold(III) reduction by the rhizobacterium *Azospirillum brasilense* with the formation of gold nanoparticles. Microb. Ecol. 2014a; 67(1):155-160. DOI 10.1007/s00248-013-0329-6.
- Tugarova A.V., Shelud'ko A.V., Dyatlova Yu.A., Filip'echeva Yu.A., Kamnev A.A. FTIR spectroscopic study of biofilms formed by the rhizobacterium *Azospirillum brasilense* Sp245 and its mutant *Azospirillum brasilense* Sp245.1610. J. Mol. Struct. 2017;1140:142-147. DOI 10.1016/j.molstruc.2016.12.063.
- Tugarova A.V., Vetchinkina E.P., Loshchinina E.A., Burov A.M., Nikitina V.E., Kamnev A.A. Reduction of selenite by *Azospirillum brasilense* with the formation of selenium nanoparticles. Microb. Ecol. 2014b;68(3):495-503. DOI 10.1007/s00248-014-0429-y.
- Tyagi S., Singh D.K. *Azospirillum himalayense* sp. nov., a *nifH* bacterium isolated from Himalayan valley soil, India. Ann. Microbiol. 2014;64(1):259-266. DOI 10.1007/s13213-013-0658-1.
- Wisniewski-Dyé F., Borziak K., Khalsa-Moyers G., Alexandre G., Sukharnikov L.O., Wuichet K., Hurst G.B., McDonald W.H., Robertson J.S., Barbe V., Calteau A., Rouy Z., Manganot S., Prigent-Combaret C., Normand Ph., Boyer M., Siguier P., Dessaux Y., Elmerich C., Condemine G., Krishnen G., Kennedy I., Paterson A.H., González V., Mavingui P., Zhulin I.B. *Azospirillum* genomes reveal transition of bacteria from aquatic to terrestrial environments. PLoS Genet. 2011;7(12):e1002430. DOI 10.1371/journal.pgen.1002430.
- Xie C.-H., Yokota A. *Azospirillum oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of the rice plant *Oryza sativa*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2005;55(4):1435-1438. DOI 10.1099/ijs.0.63503-0.
- Yang Y., Zhang R., Feng J., Wang C., Chen J. *Azospirillum griseum* sp. nov., isolated from lakewater. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2019; 69:3676. DOI 10.1099/ijssem.0.003460.

- Yegorenkova I.V., Konnova S.A., Sachuk V.N., Ignatov V.V. *Azospirillum brasilense* colonisation of wheat roots and the role of lectin-carbohydrate interactions in bacterial adsorption and root-hair deformation. *Plant Soil*. 2001;231(2):275-282. DOI 10.1023/A:1010340700694.
- Young C.C., Hupfer H., Siering C., Ho M.-J., Arun A.B., Lai W.-A., Rekha P.D., Shen F.-T., Hung M.-H., Chen W.-M., Yassin A.F. *Azospirillum rugosum* sp. nov., isolated from oil-contaminated soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2008;58(4):959-963. DOI 10.1099/ijs.0.65065-0.
- Zhou S., Han L., Wang Y., Yang G., Zhuang L., Hu P. *Azospirillum humicireducens* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from amicrobial fuel cell. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2013;63(7):2618-2624. DOI 10.1099/ijs.0.046813-0.
- Zhou Y., Wei W., Wang X., Xu L., Lai R. *Azospirillum palatum* sp. nov., isolated from forest soil in Zhejiang province, China. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 2009;55(1):1-7. DOI 10.2323/jgam.55.1.

---

**ORCID ID**

O.V. Turkovskaya [orcid.org/0000-0003-4501-4046](https://orcid.org/0000-0003-4501-4046)  
S.N. Golubev [orcid.org/0000-0002-0021-4936](https://orcid.org/0000-0002-0021-4936)

**Благодарности.** Работа частично поддержана грантом FP7 Banking Rhizosphere Micro-Organisms, European (BRIO No. 266106) – Russian initiative to set up a network of rhizosphere microbiological resources centres.

Авторы выражают искреннюю благодарность сотрудникам ИБФРМ РАН: д.б.н. Е.И. Кацы, д.б.н. В.Е. Никитиной, д.б.н. Л.Ю. Матора, д.х.н. С.Ю. Щеголеву, д.х.н. А.А. Камневу, д.б.н. А.Ю. Муратовой, к.б.н. Е.В. Дубровской, к.б.н. Ю.П. Федоненко, к.б.н. А.В. Тугаровой за консультативную помощь при написании статьи.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 19.06.2019. После доработки 21.08.2019. Принята к публикации 10.09.2019.