

## SYSTEMATYKA I ANALIZY GENOMICZNE BAKTERII Z RODZAJU *AZOTOBACTER*

Monika Kozieł\*, Anna Gałązka

Zakład Mikrobiologii Rolniczej, Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa, Państwowy Instytut Badawczy

Wpłynęło w październiku 2020 r., zaakceptowano we wrześniu 2021 r.

**Streszczenie:** Bakterie z rodzaju *Azotobacter* są przedmiotem wielu badań prowadzonych zarówno w Polsce jak i za granicą. Zainteresowanie tą grupą bakterii w dużej mierze związane jest z ich właściwościami, które mogą być wykorzystywane w rolnictwie. Najnowsze badania opierają się na zaawansowanych metodach molekularnych i bazują na poznanej sekwencji genomów dwóch gatunków: *Azotobacter vinelandii* i *Azotobacter chroococcum*. W 2009 roku Setubal i in. opublikowali pełną sekwencję genomu *Azotobacter vinelandii* DJ, z kolei pełną sekwencję genomu *Azotobacter chroococcum* 8003 opublikowali Robson i in. w pracy z 2015 roku. Obie bakterie mają pojedynczy, kolisty chromosom o wielkości odpowiednio 5,365,318 pz. i 5,192,291 pz. Poznanie i porównanie sekwencji genomów *Azotobacter vinelandii* DJ i *Azotobacter chroococcum* 8003 pozwoliło odpowiedzieć na wiele pytań dotyczących ewolucji, różnorodności i miejsca tych bakterii w środowisku. Zsekwencjonowanie większej liczby genomów innych szczepów *A. chroococcum* i *A. vinelandii* przyniosłoby wiele korzyści i pozwoliłoby uporządkować dotychczasową wiedzę na ich temat.

1. Wstęp. 2. Pozycja taksonomiczna *Azotobacter* spp. 2.1. Bliskie pokrewieństwo bakterii z rodzajów *Azotobacter* i *Pseudomonas*. 2.2. Metody molekularne porównywania i grupowania bakterii w obrębie rodzaju/gatunków *Azotobacter*. 3. Analizy genomiczne przedstawicieli *Azotobacter* spp. – szczepów *Azotobacter vinelandii* DJ i *Azotobacter chroococcum* 8003. 3.1. Porównanie genomów szczepów *Azotobacter vinelandii* DJ i *Azotobacter chroococcum* 8003. 3.2. Ruchome elementy genetyczne szczepów *Azotobacter vinelandii* DJ i *Azotobacter chroococcum* 8003. 3.3. Charakterystyka wybranych genów szczepów *Azotobacter vinelandii* DJ i *Azotobacter chroococcum* 8003. 4. Podsumowanie

### SYSTEMATICS AND GENOMIC ANALYSIS OF BACTERIA OF THE GENUS *AZOTOBACTER*

**Abstract:** Bacteria belonging to the genus *Azotobacter* are the subject of many studies conducted both in Poland and around the world. The interest in this group of bacteria is largely related to their properties being very useful for agriculture. Recent studies are based on advanced molecular methods and genomic sequence of the two species: *Azotobacter vinelandii* and *Azotobacter chroococcum*. In 2009, Setubal et al. published the complete genome sequence of *Azotobacter vinelandii* DJ, while the full sequence of *Azotobacter chroococcum* 8003 genome was published by Robson et al. in publication from 2015. Both bacteria have a single, circular chromosome of 5,355,318 bp and 5,192,291 bp respectively. Understanding and comparing the genome sequence of *Azotobacter vinelandii* DJ and *Azotobacter chroococcum* 8003 answered many questions about the evolution, diversity and location of these bacteria in the environment. The sequencing of a larger number of genomes of other *A. chroococcum* and *A. vinelandii* strains would bring many benefits and would help to organize the existing knowledge about them.

1. Introduction. 2. Taxonomic position of *Azotobacter* spp. 2.1. The close relationship of bacteria of the genera *Azotobacter* and *Pseudomonas*. 2.2. Molecular methods for comparison and grouping of bacteria in the genus/species *Azotobacter*. 3. Genomic analysis of representatives of *Azotobacter* spp. – *Azotobacter vinelandii* DJ and *Azotobacter chroococcum* 8003 strains. 3.1. Comparison of genomes of *Azotobacter vinelandii* DJ and *Azotobacter chroococcum* 8003 strains. 3.2. Mobile genetic elements of *Azotobacter vinelandii* DJ and *Azotobacter chroococcum* 8003 strains. 3.3. Characteristics of selected genes of *Azotobacter vinelandii* DJ and *Azotobacter chroococcum* 8003 strains. 4. Summary

**Słowa kluczowe:** *Azotobacter* spp., taksonomia, identyfikacja genetyczna, sekwencja genomu

**Keywords:** *Azotobacter* spp., taxonomy, genetic identification, genome sequence

### 1. Wstęp

*Azotobacter* spp. to wolno-żyjące, ściśle aerobowe, heterotroficzne bakterie Gram-ujemne. Należą one do rodziny *Pseudomonadaceae*, zaliczanej do klasy  $\gamma$ -Proteobacteria. W 1901 roku Martinus Beijerinck wyizolował, oznaczył i opisał pierwszy gatunek należący do tego rodzaju taksonomicznego – *Azotobacter chroococcum* [82]. Obecnie rodzaj ten grupuje łącznie

osiem gatunków. Thompson i Skerman [84] przeprowadzili pierwsze szczegółowe badania taksonomiczne i ekologiczne *Azotobacter* spp., obejmujące również analizę wielu właściwości morfologicznych, fizjologicznych i biochemicznych tych bakterii. *Azotobacter* spp. charakteryzuje wiele ciekawych cech, takich jak zdolność do wiązania azotu atmosferycznego [56], wytwarzanie odpornych na wysychanie cyst [82], produkcja licznych związków stymulujących wzrost i rozwój roślin

\* Autor korespondencyjny: mgr Monika Kozieł, Zakład Mikrobiologii Rolniczej, Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa, Państwowy Instytut Badawczy, ul. Czartoryskich 8, 24-100 Puławy; tel. 81 478 69 52; e-mail: mmaczka@iung.pulawy.pl

(np. auksyn, cytokin, giberelin, witamin, czy sideroforów) [1, 3, 5, 23, 47, 70], a także produkcja polihydroksymaślanu [22, 57, 61, 71, 79] i zewnątrzkomórkowych polisacharydów (tj. alginianów, celulozy).

Bakterie *Azotobacter* sp. były wielokrotnie wykorzystywane jako organizmy modelowe w badaniach niektórych podstawowych procesów życiowych, np. procesów wykorzystywania różnych źródeł węgla i energii (węglowodany, kwasy organiczne, alkohole), procesów oddychania komórkowego (cykl kwasów trikarboksylowych, łańcuch transportu elektronów), biosyntezy nitrogenu i regulacji wiązania azotu atmosferycznego, procesów wytwarzania cyst, produkcji pigmentów czy zdolności poruszania się [53, 68]. Badania prowadzone z udziałem *Azotobacter vinelandii* i *A. chroococcum* pozwoliły na lepsze zrozumienie fizjologicznych, biochemicznych i genetycznych podstaw wiązania N<sub>2</sub> i metabolizmu H<sub>2</sub> [8, 32, 34].

Przedstawiciele *Azotobacter* spp. zasiedlają wiele środowisk, takich jak: gleba, woda, osady ściekowe, ryzosfera i fytosfera roślin. Bakterie te występują w różnych strefach klimatycznych, liczne szczepy izolowane są nawet z rejonów tropikalnych i polarnych [4, 6, 18, 27]. Preferują one gleby o odczynie neutralnym i lekko zasadowym, natomiast rzadko występują w glebach kwaśnych o pH poniżej 6 [49, 51]. Zaobserwowano, że występowanie i liczebność populacji tej grupy bakterii jest często skorelowana z innymi czynnikami środowiskowymi, tj. właściwościami gleby (np. zawartością materii organicznej, wilgotnością, żyznością, stosunkiem C/N, pH) i warunkami klimatycznymi [83].

Zainteresowanie badaczy od dawna budzi ekologiczna rola *Azotobacter* spp. oraz możliwość praktycznego wykorzystania tych bakterii w wytwarzaniu biopreparatów stosowanych jako nawozy. Wyniki badań potwierdzają, że inokulacja nasion bakteriami *Azotobacter* spp. zwiększa wydajność plonowania roślin uprawnych, w tym: kukurydzy [25], pszenicy [9, 38] i ryżu [33]. Prowadzone są również badania molekularne *Azotobacter* spp., w których planowaniu pomocne są poznane sekwencje genomów szczepów *A. vinelandii* i *A. chroococcum* [68, 73]. Aspekty związane z genomiką bakterii z rodzaju *Azotobacter* zostały dość szczegółowo opisane w literaturze [35, 64, 68, 73, 74].

Niniejsza praca systematyzuje aktualne doniesienia z zakresu taksonomii i genomiki *Azotobacter* spp., a także przedstawia, w syntetycznej formie, aktualny stan wiedzy w tym zakresie.

## 2. Pozycja taksonomiczna *Azotobacter* spp.

Rodzaj *Azotobacter* pierwotnie zaliczono do rodziny *Azotobacteraceae* [76], jednak po przeprowadzeniu szczegółowych analiz filogenetycznych został on prze-

klasyfikowany do rodziny *Pseudomonadaceae* [36]. W obrębie rodzaju *Azotobacter* wyróżniono 8 gatunków i 4 podgatunki:

- *Azotobacter armeniacus* [84],
- *Azotobacter beijerinckii* [44],
- *Azotobacter bryophylli* [45],
- *Azotobacter chroococcum* [10] (subsp. *chroococcum* [29] i subsp. *isscasi* [29]),
- *Azotobacter nigricans* [39] (subsp. *achromogenes* [84] i subsp. *nigricans* [24]),
- *Azotobacter paspali* [17],
- *Azotobacter salinestrus* [56],
- *Azotobacter vinelandii* [43].

Spośród wyżej wymienionych gatunków, *Azotobacter chroococcum* jest najbardziej rozpowszechniony w glebach całego świata i dominuje on również w glebach Polski [19, 41, 48]. Kolonie tych bakterii mają nieregularny kształt, wzniesienie wypukłe, są śluzowate, dość duże, a po kilkudniowej hodowli na podłożu stałym zmieniają barwę na ciemną, co związane jest z produkcją ciemnobrunatnego pigmentu melaninowego. Komórki bakterii *A. chroococcum* są ruchliwe dzięki obecności peritrichalnych rzęsek [3, 82]. Innymi gatunkami bakterii rodzaju *Azotobacter* występującymi tylko w glebach są *Azotobacter beijerinckii*, *A. nigricans* oraz *A. salinestrus*, z czego dwa pierwsze są nieruchliwe. Komórki *Azotobacter beijerinckii* tworzą gładkie kolonie, większe od kolonii *A. chroococcum*, Ponadto, wytwarzają nieprzenikający do podłoża pigment o barwie od żółtej do jasnobrażowej [82]. *Azotobacter nigricans* również tworzy gładkie kolonie i wytwarza pigment o barwie od brązowo-czarnej do czerwono-fioletowej [82]. Z kolei gatunek *A. salinestrus* wytwarza ciemnobrunatny pigment niedyfundujący do podłoża [56]. Bakterie tego gatunku rosną w postaci dużych, owalnych kolonii o nieregularnych brzegach. Poruszają się za pomocą peritrichalnie ułożonych rzęsek. Podczas aktywnego wzrostu komórki mogą występować w parach, czasami tworzą różnej długości łańcuchy. Gatunek ten wyizolowany został z lekko kwaśnych gleb zachodniej Kanady.

Bakterie klasyfikowane w obrębie rodzaju *Azotobacter* spotykane są również w wodach. Gatunkami występującymi zarówno w glebie, jak i w wodzie są *A. armeniacus* i *A. vinelandii*. Oba gatunki poruszają się za pomocą peritrichalnie ułożonych rzęsek. *A. armeniacus* rośnie w postaci dużych, gładkich, wypukłych, błyszczących i śluzowatych kolonii. Gatunek ten wytwarza brązowo-czarny barwnik niedyfundujący do podłoża [3, 82]. Z kolei kolonie wytwarzane przez *A. vinelandii* są okrągłe, słabo śluzowate, mniejsze w porównaniu z komórkami *A. chroococcum*. Gatunek ten wytwarza żółto-zielony fluoryzujący pigment dyfundujący do podłoża [3, 82].

Nietypowym środowiskiem występowania bakterii *Azotobacter* jest ryzosfera trawy gatunku *Paspalum*

*notatum* [3, 82]. Występuje tam gatunek *Azotobacter paspali* poruszający się za pomocą peritrichalnych rzęsek. Na podłożach stałych tworzy kolonie szorstkie, matowe z pofalowanymi brzegami. Bakterie należące do tego gatunku są zdolne do produkcji brązowo-czarnego pigmentu i występują jedynie w ryzosferze trawy

Najpóźniej poznany gatunek rodzaju *Azotobacter* to *A. bryophylli*, który został opisany przez Liu i wsp. w 2019 roku [45]. Szczep typowy dla tego gatunku to *A. bryophylli* L461<sup>T</sup>, wyizolowano w Chinach z liści rośliny żyworoćki pierzastej (*Bryophyllum pinnatum*). W przeciwieństwie do większości przedstawicieli rodzaju *Azotobacter*, *A. bryophylli* L461<sup>T</sup> nie produkuje żadnego pigmentu. Szczep ten wykorzystuje jako źródło węgla i energii m.in.: L-arabinozę, ester metylowy kwasu pirogronowego, kwas  $\alpha$ -ketoglutarynowy, mleczan, kwas bursztynowy i kwas bromobursztynowy, a ponadto wykazuje oporność na spektynomycynę, streptomycynę, chloramfenikol, tetracyklinę, cefotaksym i karbenicylinę. Zawartość par zasad G + C w sekwencji nukleotydowej genomu szczepu L461<sup>T</sup> wynosi 64,9 mol%, co mieści się w zakresie charakterystycznym dla rodzaju *Azotobacter* (63–67,5 mol%) [84].

Ostatnie lata pokazują, iż bakterie *Azotobacter* spp. są nadal ważnym przedmiotem wieloaspektowych badań, a charakterystyka nowo wyizolowanego gatunku, *A. bryophylli* poszerza wiedzę na temat tych bakterii.

### 2.1. Bliskie pokrewieństwo bakterii z rodzajów *Azotobacter* i *Pseudomonas*

Bakterie z rodzajów *Azotobacter* i *Pseudomonas* charakteryzuje duża plastyczność struktury genomów oraz zdolność adaptacji do różnych warunków bytowania. Bakterie te nie tylko zasiedlają podobne środowiska, lecz również mają wiele wspólnych cech, czego przykładem jest zdolność do wiązania azotu atmosferycznego i produkcji alginianu [12, 88]. Pierwotnie uważano, że bakterie należące do rodzaju *Pseudomonas* nie wiążą azotu [58], jednak w toku badań wykazano, że niektóre szczepy mają tę zdolność, a geny odpowiedzialne za ten proces są bardzo podobne do genów występujących u *A. vinelandii* [88, 90]. Alginiany wytwarzane są zarówno przez bakterie *Azotobacter* spp., jak i przez kilka gatunków z rodzaju *Pseudomonas*, a przykład stanowi *Pseudomonas aeruginosa*, u którego alginiany są produktem ubocznym metabolizmu i odkładane są w płucach ludzi chorych na mukowiscydozę [26]. Do cech odróżniających te dwa rodzaje można zaliczyć morfologię i ruchliwość komórek [58]. Pewne różnice w fenotypach tych bakterii wynikają prawdopodobnie ze specyficznych właściwości adaptacyjnych, na co wskazuje obecność w genomach pokrewnych zestawów genów metabolizmu podstawowego oraz genów kon-

Tabela I

Cechy charakterystyczne dla genomów *Azotobacter vinelandii* DJ i *Pseudomonas stutzeri* A1501

Cecha charakterystyczna	<i>Azotobacter vinelandii</i> DJ	<i>Pseudomonas stutzeri</i> A1501
Wielkość genomu (pz)	5 365 318	4 567 418
%GC	65,7	63,9
Całkowita liczba genów kodujących białka	5 051	4 128
Liczba operonów rRNA	6	4
tRNA	64	61
16S rRNA	6	4

Na podstawie [57, 77, 78].

serwatywnych, zachowanych w obu grupach bakterii w toku ewolucji [90].

Liczne badania, oparte m.in. na analizach sekwencji genów metabolizmu podstawowego i genu 16S rRNA bakterii potwierdzają bliskie pokrewieństwo rodzajów *Azotobacter* i *Pseudomonas*. Rediers i wsp. [64] badali zależności filogenetyczne pomiędzy *A. vinelandii* a bakteriami z rodzaju *Pseudomonas*, opierając się na wynikach sekwencjonowania fragmentu genu 16S rRNA tych bakterii. Na podstawie uzyskanych danych stwierdzono, że szczep *A. vinelandii* OP należy do tej samej grupy genetycznej co *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, a poziom identyczności sekwencji badanego fragmentu genu 16S rRNA obu szczepów wynosił 96%. Anzai i wsp. [2] na podstawie wyników uzyskanych z podobnych analiz również odnotowali bliskie pokrewieństwo bakterii *Azotobacter* spp. i *Pseudomonas* spp. Young i Park [90] analizując sekwencje genów 16S rRNA tych bakterii zauważyli, że badane gatunki *Azotobacter* (*A. beijerinckii*, *A. chroococcum*, *A. paspali* i *A. vinelandii*) są najbliższymi spokrewnionymi z *P. aeruginosa* i *P. resinovorana*. Co więcej, analiza sekwencji genów *atpD*, *carA* i *recA* wykazała, że szczepy należące do rodzaju *Azotobacter* stanowią pojedynczą, niejednorodną grupę na drzewie filogenetycznym, bardzo blisko spokrewnioną z ww. gatunkami. Do podobnych wniosków doszli Özen i Ussery [55], którzy przeprowadzili szczegółowe analizy porównawcze stopnia genetycznego podobieństwa pomiędzy *A. vinelandii*, a szczepami bakterii z rodzaju *Pseudomonas*. Wyniki tych analiz potwierdziły, że wysoki poziom podobieństwa pomiędzy szczepami może świadczyć o przynależności tego gatunku do rodzaju *Pseudomonas*. Setubal i wsp. [73] opierając się na wynikach analiz filogenetycznych i poznanej sekwencji genomu *A. vinelandii* DJ wykazali, że gatunek ten jest najbliższymi spokrewnionymi z bakteriami z rodziny *Pseudomonadaceae*, a najbliższym krewnym okazał się gatunek wiążący azot atmosferyczny – *Pseudomonas stutzeri* A1501. W 2015 roku Setubal i Almeida [74], wykorzystując zdeponowane w bazie GenBank sekwencje

genomowe wybranych szczepów bakterii z rodzaju *Azotobacter* i *Pseudomonas*, uzyskali drzewa filogenetyczne obrazujące genetyczne podobieństwo pomiędzy badanymi szczepami. Analiza uzyskanych dendrogramów wyraźnie pokazała, że bakterie z rodzaju *Azotobacter* tworzą odrębną grupę genetyczną. Bliskie pokrewieństwo bakterii należących do rodzajów *Azotobacter* oraz *Pseudomonas* potwierdziła również niedawno wykonana analiza porównawcza sekwencji genu 16S rRNA szczepu *Azotobacter bryophylli* L461<sup>T</sup>. Wykazano jej najwyższe podobieństwo (97,82%) do homologicznej sekwencji *A. beijerinckii* JCM 20725<sup>T</sup>, a także *A. chroococcum* ATCC 9043<sup>T</sup> (97,34%), *Pseudomonas guguanensis* CC-G9A<sup>T</sup> (96,84%), *Pseudomonas panipatensis* Esp-1<sup>T</sup> (96,77%), *A. paspali* ATCC 23833<sup>T</sup> (96,16%) i *A. nigricans* subsp. *nigricans* IAM 15005<sup>T</sup> (95,98%). Wyniki przeprowadzonych analiz wskazują, że szczep *A. bryophylli* L461<sup>T</sup> usytuowany jest na oddzielnej gałęzi drzewa filogenetycznego rodzaju *Azotobacter*, w bliskim sąsiedztwie *A. beijerinckii* JCM 20725<sup>T</sup> i *A. chroococcum* ATCC 9043<sup>T</sup> [45]. Wyniki te wskazują także na bliskie pokrewieństwo bakterii z rodzajów *Azotobacter* i *Pseudomonas*, które klasyfikowane są wspólnie w rodzinie *Pseudomonadaceae*.

## 2.2. Metody molekularne porównywania i grupowania bakterii w obrębie rodzaju/gatunków *Azotobacter*

Szybki rozwój metod biologii molekularnej przyczynił się do usprawnienia procesu identyfikacji mikroorganizmów, w tym także bakterii z rodzaju *Azotobacter*. Autorzy publikacji naukowych, wykorzystując różne metody molekularne, podejmują próby identyfikacji i oceny zróżnicowania genetycznego szczepów bakterii *Azotobacter* spp. izolowanych z próbek środowiskowych.

W roku 2012 Lenart [41] zbadała zróżnicowanie genetyczne 43 szczepów bakterii, wstępnie zaklasyfikowanych do gatunku *Azotobacter chroococcum*, wyizolowanych ze 100 próbek glebowych pobranych na terenie województwa małopolskiego i śląskiego. W celu potwierdzenia pozycji taksonomicznej tych izolatów przeprowadzono analizę restrykcyjną bakteryjnego regionu ITS (internal transcribed spacer) położonego między genami 16S i 23S rRNA. Wykorzystano technikę ITS-RFLP (ITS Restriction Fragment Length Polymorphism). Analiza restrykcyjna amplifikowanych fragmentów 16S-23S rDNA badanych szczepów nie wykazała jednak zróżnicowania izolatów, zatem, wykorzystano dwie inne metody genetycznego odcisku palca (fingerprinting) – PCR MP (PCR Melting Profile) i RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). Metody te bardzo często stosowane są w ocenie zmienności mikroorganizmów, a do ich zalet można zaliczyć: wysoką siłę dyskryminacji, powtarzalność i łatwość interpretacji

wyników. Wyniki uzyskane tymi metodami okazały się porównywalne i wykazały wysoki stopień zróżnicowania bakterii *A. chroococcum*. Porównując technikę ITS-RFLP z metodami typowania genetycznego – MP PCR oraz RAPD stwierdzono, że dwie ostatnie metody są bardziej użyteczne w przypadku różnicowania wewnątrzgatunkowego *A. chroococcum*, natomiast pierwsza z wymienionych może być stosowana do szybkiej identyfikacji tych bakterii na poziomie gatunku.

W 2014 roku Lenart-Boroń i wsp. [42] określili przynależność gatunkową szczepów *Azotobacter* spp. wyizolowanych z gleb przemysłowych i rolniczych pobranych z terenów Nowej Huty w Krakowie. Identyfikacja taksonomiczna izolatów wykazała obecność w pobranych próbkach glebowych trzech gatunków – *A. chroococcum*, *A. salinestris* i *A. vinelandii*. Różnorodność bakterii należących do wyżej wymienionych gatunków określono przy użyciu metod – RAPD i Rep-PCR (BOX). Przeprowadzone badania wykazały wysokie zróżnicowanie wewnątrzgatunkowe bakterii. Metodę RAPD wykorzystali również w swoich badaniach Marwa i wsp. [50], w celu oceny stopnia zróżnicowania szczepów *A. chroococcum* wyizolowanych w Egipcie. Zastosowanie tej metody pozwoliło na określenie stopnia genetycznego podobieństwa pomiędzy wyizolowanymi szczepami *A. chroococcum*, a także szczepem referencyjnym użytym w doświadczeniu. Z kolei metodę Rep-PCR wykorzystali Rubio i wsp. [69]. Potwierdzili, iż Rep-PCR jest odpowiednią metodą do klasyfikacji taksonomicznej izolatów *Azotobacter* spp. i oceny różnorodności genetycznej pomiędzy gatunkami *A. chroococcum*, *A. salinestris* i *A. armeniacus*.

Kolejną metodą służącą do określenia zróżnicowania szczepów *Azotobacter* spp. jest technika ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) zastosowana w 2014 roku przez Mazinani i Asgharzadeh [51]. Materiałem do badań była gleba ryzosferowa pobrana na terenach środkowego Iranu. Na podstawie uzyskanych wyników, naukowcy stwierdzili, że metoda ARDRA, charakteryzująca się odpowiednio wysoką siłą dyskryminacji, jest użyteczna do identyfikacji bakterii z rodzaju *Azotobacter*, a także do oceny poziomu podobieństwa pomiędzy wyodrębnionymi grupami genetycznymi. Wykorzystując tę metodę również Aquilanti i wsp. [3] określili przynależność gatunkową 196 szczepów bakterii wyizolowanych z 35 próbek glebowych pobranych we Włoszech. Zastosowanie dwóch enzymów restrykcyjnych, RsaI i HhaI, pozwoliło na wyraźne zróżnicowanie wszystkich badanych szczepów bakterii na podstawie porównania profili genetycznych charakterystycznych dla poszczególnych gatunków. Otrzymane wyniki pozwoliły stwierdzić, że wśród wyizolowanych bakterii przeważał gatunek *A. chroococcum*. Tę samą metodę zastosowali ponownie Aquilanti i wsp. [4] do oceny zmienności 76 szczepów środowiskowych. W obrębie

analizowanych bakterii znalazło się 28 szczepów referencyjnych z rodzajów: *Azotobacter*, *Azomonas*, *Azospirillum*, *Beijerinckia*, *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium* i *Pseudomonas*, a także 48 izolatów pozyskanych z gleb środkowych Włoch. Analizując dendrogram wykreślony na podstawie wyników uzyskanych z wykorzystaniem metody ARDRA, naukowcy zaobserwowali wyraźne podobieństwo między rodzajami: *Azotobacter*, *Azomonas*, *Azospirillum* i *Beijerinckia*. Gatunkami najbardziej podobnymi w obrębie rodzaju *Azotobacter* okazały się: *A. vinelandii* i *A. paspali*. Jiménez i wsp. [28] również wykorzystali technikę ARDRA do identyfikacji i oceny zróżnicowania genetycznego szczepów bakterii należących do rodzaju *Azotobacter* wyizolowanych z gleb spod upraw warzyw w Kolumbii.

W roku 2020 ukazała się praca Khosravi i Dolatabad [37], w której porównano kilka metod molekularnych oznaczania różnorodności bakterii. Analizie poddano 12 izolatów *Azotobacter* spp. zaliczonych na podstawie cech morfologicznych i fizjologicznych, do gatunku *A. chroococcum*. Badania wykonano z użyciem technik: Rep-PCR, ERIC-PCR, BOX-PCR, a także ARDRA, z zastosowaniem 3 enzymów restrykcyjnych HpaII, RsaI i AluI. Na podstawie przeprowadzonych analiz stwierdzono, że tylko 4 z 12 izolatów należą do gatunku *A. chroococcum*, a pozostałe zidentyfikowano jako *A. salinestris*. Wykazano, że trawienie regionu 16S rDNA enzymem restrykcyjnym HpaII pozwala na rozróżnienie tych gatunków. Ponadto metody Rep-PCR i BOX-PCR skutecznie różniły *A. chroococcum* i *A. salinestris*. Markery BOX i REP pozwoliły także zróżnicować izolaty należące do tego samego gatunku, dlatego zalecane są do określania zmienności wewnątrzgatunkowej *A. chroococcum* i *A. salinestris*.

Jeszcze jedną, często stosowaną metodą służącą do identyfikacji i sprawdzania stopnia genetycznego podobieństwa między szczepami *Azotobacter* spp., jest sekwencjonowanie genu 16S rRNA. Obele i wsp. [54] wyizolowali i zidentyfikowali przy użyciu standardowych metod mikrobiologicznych 8 szczepów z rodzaju *Azotobacter*. Analiza sekwencji genu 16S rRNA jednego z nich wykazała 96% stopień podobieństwa genetycznego w stosunku do szczepu referencyjnego *A. chroococcum* zdeponowanego w bazie RDP Gen Bank. Z kolei, Liu i wsp. [45] bazując na wynikach sekwencjonowania genów 16S rRNA znanych gatunków bakterii należących do rodzaju *Azotobacter* i *Pseudomonas* określili poziom podobieństwa genetycznego pomiędzy tymi bakteriami, a nowo wyizolowanym gatunkiem *A. bryophylli*.

Dynamiczny rozwój techniki biologii molekularnej przyczynia się do ciągłego rozwoju i udoskonalania metod typowania molekularnego. Wśród opisywanych w literaturze metod różnicowania bakterii *Azotobacter* spp. trudno jest znaleźć metodę idealną. Z badań wynika, że najlepsze rezultaty można otrzymać sto-

sując jednocześnie dwie lub trzy metody molekularnego odcisku palca. Do najważniejszych parametrów, którymi powinny charakteryzować się metody genotypowania należą: duża moc dyskryminacyjna, jednoznaczność otrzymanych wyników, prostota wykonania, szybkość wykonania oraz powtarzalność wyników [40].

### 3. Analizy genomiczne przedstawicieli *Azotobacter* spp. – szczepów *Azotobacter vinelandii* DJ i *Azotobacter chroococcum* 8003

Pełną sekwencję genomu bakterii należących do rodzaju *Azotobacter* poznano jedynie dla dwóch gatunków – *A. chroococcum*, szczep NCIMB 8003 i *A. vinelandii*, szczep DJ. Dokładne poznanie i porównanie sekwencji genomów tych szczepów dostarczyło wielu ciekawych informacji na temat ewolucji i zróżnicowania tej grupy bakterii.

#### 3.1. Porównanie genomów szczepów *Azotobacter vinelandii* DJ i *Azotobacter chroococcum* 8003

Gatunek *A. vinelandii* od wielu lat jest przedmiotem badań i można go uznać za modelowy mikroorganizm w badaniach nad biochemią wiązania  $N_2$ , strukturą przestrzenną i funkcjonowaniem nitrogenazy oraz genetyczną regulacją biologicznego wiązania azotu atmosferycznego [53, 59]. Aktualnie prowadzone badania bazujące na metodach molekularnych opierają się na poznanej w roku 2009 pełnej sekwencji genomu *A. vinelandii* DJ [73, 74]. Szczep ten ma pojedynczy, kolisty chromosom o wielkości 5 365 318 pz. Chromosom *A. vinelandii* DJ zawiera 6 kompletnych operonów rRNA, a także 64 genów tRNA. Zawartość par zasad G+C w sekwencji nukleotydowej chromosomu wynosi 65,7%. Badania genomu *A. vinelandii* DJ pozwoliły jak dotąd zidentyfikować 5051 genów kodujących białka spośród których 46% wykazuje podobieństwo do genów *Pseudomonas stutzeri* A1501 [73, 74].

Z kolei przedstawiciel gatunku *Azotobacter chroococcum*, szczep *A. chroococcum* NCIMB 8003, został wyizolowany w USA w 1934 roku [77]. Pierwsze badania, w których wykorzystano ten szczep, dotyczyły zapotrzebowania bakterii z rodzaju *Azotobacter* na pierwiastki śladowe [78]. Szczep ten został szczegółowo opisany przez Thomsona i Skermana [84] i jest prawdopodobnie najlepiej dotąd scharakteryzowanym szczepem gatunku *A. chroococcum*. Wykorzystany został w badaniach nad budową i funkcjonowaniem nitrogenazy zawierającej jako kofaktor molibden [30, 31, 89] i wanad [66, 67], poznaniem fizjologicznych mechanizmów chroniących nitrogenazę przed szkodliwym wpływem  $O_2$  *in vivo* [14, 15, 20, 62, 65], syntezą poli- $\beta$ -hydroksymaślanu [80] oraz syntezą alginanu

Tabela II  
Porównanie genomów *Azotobacter chroococcum* 8003 i *Azotobacter vinelandii* DJ

Szczep <i>Azotobacter</i>	Wielkość (pz)	GC %	Geny kodujące białka	Geny kodujące rRNA	Geny kodujące tRNA	Non-coding RNA	Pseudo-geny	Total functional Genes
<b>Ac-8003</b>								
Chromosom	4 591 803	66,3	3 959	18	66	44	72	4 087
Plazmid pAcX50f	311 724	62,7	292	0	0	4	13	296
Plazmid pAcX50e	132 372	61,9	111	0	0	4	10	115
Plazmid pAcX50d	69 317	59,2	55	0	0	3	7	58
Plazmid pAcX50c	62 783	56,7	49	0	0	1	2	50
Plazmid pAcX50b	13 852	55,3	10	0	0	2	0	12
Plazmid pAcX50a	10 435	58,1	9	0	0	1	0	10
Ac-8003 (całkowity genom)	5 192 291	65,7	4 485	18	66	59	104	4 628
<b>Av-DJ</b>								
Chromosom	5 365 318	65,7	4 660	18	64	47	64	4 789

Na podstawie [72].

[60]. W 2015 roku Robson i wsp. [68] opublikowali pełną sekwencję genomu *A. chroococcum* NCIMB 8003 (ATTC 4412). Genom tej bakterii składa się z 7 kolistych replikonów o sumarycznej wielkości 5 192 291 pz obejmujących: kolisty chromosom (4 591 803 pz) oraz sześć plazmidów oznaczonych symbolami pAcX50 a-f o wielkości w zakresie od 10 kb do 311,7 kb. Chromosom *A. chroococcum* NCIMB 8003 zawiera 6 kompletnych operonów rRNA, podobnie jak chromosom *A. vinelandii* DJ, a także 66 genów tRNA, zatem o dwa więcej niż omawiany szczep *A. vinelandii* (jeden z tych genów znajduje się w obrębie profaga). Zawartość par zasad G+C w sekwencji nukleotydowej chromosomu wynosi 66,27%, natomiast w przypadku plazmidów zawiera się w zakresie od 58,12% do 62,67%. Wyróżniono 4 628 genów kodujących białka spośród których 568 (12,2%) to geny plazmidowe. Około 65% genomu (3 048 genów kodujących białka) wykazuje wysoki stopień identyczności sekwencji (85%) z sekwencją genów *A. vinelandii* DJ, a około 23% genomu (1 071 genów kodujących białka) wykazuje podobieństwa z genami różnych gatunków z rodzaju *Pseudomonas*, 43 geny z gatunkami z rodzaju *Burkholderia* i mniejsza liczba genów z przedstawicielami rodzajów: *Halomonas*, *Escherichia*, *Azoarcus*, *Singulospharea*, *Aromatoleum*, *Ralstonia*, *Cuprividus*, *Polaromas* i *Acidovorax* [68].

W wyniku analizy porównawczej dwóch dostępnych sekwencji genomowych stwierdzono, że genom rdzeniowy, wspólny dla obu *Azotobacter* spp., obejmuje około 3000 genów. W genomie *A. vinelandii* DJ znajduje się około 2000 genów unikatowych dla tego szczepu, które nie występują w NCIMB 8003, a w genomie *A. chroococcum* NCIMB 8003 takich specyficznych dla szczepu genów jest nieco mniej – 1700. Genom rdzeniowy obejmuje geny niezbędne dla przebiegu

wielu szlaków metabolicznych, zawiera również geny odpowiadające za charakterystyczne cechy fenotypowe *Azotobacter* spp., np. determinujące zakres wykorzystanych przez te bakterie źródeł węgla i energii, a także wysoce konserwatywne i dobrze przebadane grupy genów *nif* i *vnf* kodujące nitrogenazę, odpowiednio, typu I i II. Geny te usytuowane są w kilku regionach genomów tych bakterii. *A. vinelandii* posiada również geny *anf*, specyficzne dla nitrogenazy III, zawierającej jako kofaktor tylko jony żelaza [68].

### 3.2. Ruchome elementy genetyczne szczepów *Azotobacter vinelandii* DJ i *Azotobacter chroococcum* 8003

Szczep *Azotobacter vinelandii* DJ nie zawiera plazmidów. Nie należy jednak wykluczyć, iż gatunek pozbawiony jest całkowicie plazmidom, ponieważ w roku 1988 badacze Maia i wsp. [46] z wykorzystaniem 32 szczepów *A. vinelandii* wykazali, że w 6 z nich występowały plazmidy, o wielkości w zakresie od 13 kb do 78 kb. Z kolei, w genomie *A. chroococcum* NCIMB 8003 występuje duża liczba różnorodnych plazmidów oraz elementów transpozycyjnych – sekwencji inercyjnych (IS) i transpozonów (Tn). Badając fragmenty IS w ponad 100 genomach bakteryjnych Touchon i Rocha [87] doszli do wniosku, że wielkość genomu i warunki środowiskowe, były głównymi czynnikami, które pozytywnie korelowały z liczbą IS w genomach bakteryjnych. Potwierdziło to fakt, że rodziny IS nie są na ogół specyficzne dla danego taksonu bakterii i są często nabywane oraz tracone w toku ewolucji. Elementy te mogą odgrywać istotną rolę w determinowaniu zmienności i ewolucji genomu poprzez promowanie rearanżacji i mutacji, np. typu delekcji i duplikacji [75]. Inne

badania wykazały, iż w obrębie ruchomych elementów genetycznych *Azotobacter* mogą występować takie, których aktywność prowadzi do powstania białek lub związków, wydalanych przez bakterie do środowiska. Może to mieć korzystny lub szkodliwy wpływ na inne współwystępujące organizmy [63]. Na przykład występowanie na plazmidzie pAcX50f szczepu NCIMB 8003 genów kompletnego szlaku syntezy pierścienia korynowego może być korzystne nie tylko dla komórek gospodarza, lecz także, dla organizmów, które muszą pozyskiwać witaminę B12 ze środowiska. El-Essawy i wsp. [21] opisali naturalny szczep *A. chroococcum* nadprodukujący witaminę B12. Warto również zauważyć, że obecność zależnej od witaminy B12 reduktazy rybonukleotydowej, zarówno w genomie *A. chroococcum* NCIMB 8003, jak i *A. vinelandii* DJ, a także w genomach 3 z 8 gatunków bakterii z rodzaju *Pseudomonas* [91], mogłoby umożliwić syntezę deoksyrybonukleotydów, zwłaszcza w warunkach tlenowych [86], co dodatkowo potwierdza, że bakterie należące do rodzaju *Azotobacter* są typowymi aerobami [73].

Analiza plazmidomu szczepu *A. chroococcum* NCIMB 8003 wykazała, że w większości przypadków geny plazmidowe kodują białka podobne do tych, spotykanych u bakterii z rodzaju *Pseudomonas*. Jedynie plazmid pAcX50c wykazał cechy charakterystyczne dla plazmidów spotykanych u bakterii *Burkholderia*. Wielkości plazmidów wahają się od największego pAcX50f, 311 724 pz, zawierającego 292 geny kodujące białka, do najmniejszego pAcX50a, 10 435 pz, na którym zlokalizowano 9 genów kodujących białka.

### 3.3. Charakterystyka wybranych genów szczepów *Azotobacter vinelandii* DJ i *Azotobacter chroococcum* 8003

Najszerzej scharakteryzowaną grupą genów występujących u przedstawicieli rodzaju *Azotobacter* są geny związane z mechanizmem wiązania azotu atmosferycznego [13, 16, 52, 68, 85]. Enzymem mającym decydujące znaczenie w tym procesie jest nitrogenaza. *A. vinelandii* może wytwarzać aż trzy rodzaje nitrogenazy, w zależności od warunków środowiskowych:

- nitrogenazę I (geny *nifD*, *nifK*, *nifH*), zawierającą koenzym Fe-Mo-Co (jest wytwarzana, gdy w środowisku występują jony molibdenu),
- nitrogenazę II (geny *vnfD*, *vnfK*, *vnfH*), zawierającą jako kofaktor Fe-V-Co (powstaje w warunkach deficytu molibdenu, gdzie pierwiastek ten zastępowany jest cząsteczką wanadu),
- nitrogenazę III (geny *anfD*, *anfK*, *anfH*), w której kofaktorem jest jedynie jony żelaza [7].

W wyniku porównania pełnej sekwencji genomów szczepów *A. chroococcum* NCIMB 8003 i *A. vinelandii* DJ stwierdzono, iż geny *anf* są specyficzne jedynie dla

szczepu DJ. Z kolei geny *nif* *A. chroococcum* 8003 wykazują wysoki stopień identyczności sekwencji z sekwencją genów *A. vinelandii* DJ, a jedną z różnic jest obecność w genomie szczepu 8003 genu kodującego ferrodoksynę 4Fe-4S. Poza strukturalnymi genami kodującymi reduktazę dinitrogenazy (*nifH*) i dinitrogenazę (*nifD*, *nifK*), do istotnych genów *nif* należą geny regulatorowe *nifL* i *nifA* oraz geny biorące udział w transporcie molibdenu i biosyntezie kofaktora nitrogenazy (*nifB*, *nifQ*) [68]. Wśród genów związanych z aktywnością nitrogenazy znalazły się również geny *alg* kodujące alginiany. Alginiany odgrywają istotną rolę w ochronie nitrogenazy przed szkodliwym wpływem tlenu oraz w procesie tworzenia cyst [11, 71, 72]. W genomach obu szczepów potwierdzono obecność 12 genów *alg* uczestniczących w syntezie alginianu, liniowego kopolimeru kwasu  $\beta$ -D-mannuronowego i kwasu  $\alpha$ -L-gulonowego. W przypadku *A. vinelandii* DJ, siedem spośród tych genów koduje epimerazy mannuronanowe C-5 (*algE1*, *algE2*, *algE3*, *algE4*, *algE5*, *algE6* i *algE7*), które modyfikują polimer poza komórkami bakterii. Z kolei pięć innych genów koduje regulatory syntezy alginianu (*algR*, *algB*, *algP*, *algQ* i *amrZ*). W genomie *A. chroococcum* NCIMB 8003 wykryto jedynie cztery geny *algE* (*algE1*, *algE2*, *algE3* i *algE4*). Do innych regulatorów syntezy alginianu należą: operon *algU-mucABCD*, geny proteazy *algW*, *mucP* i *prc* oraz gen cykazy diguanylanowej *mucR* [73]. Geny *mucABCD* są takie same u obu szczepów, natomiast w genie *algU* *A. vinelandii* DJ wykryto sekwencję insercyjną o długości około 1 kb zlokalizowaną blisko regionu kodującego N-terminalny region białka [68].

Inną ważną grupą genów występujących u omawianych szczepów bakterii, są geny zaangażowane w produkcję sideroforów biorących udział w wychwytywaniu żelaza. Pozyskiwanie Fe ze środowiska jest ważnym czynnikiem wpływającym na wzrost i rozwój drobnoustrojów, w tym także tych z rodzaju *Azotobacter* [52]. *A. vinelandii* w warunkach niedoboru żelaza w środowisku wydziela żółtozielone fluorescencyjne siderofory (azotobaktynę), należące do rodziny piowerdyn [16]. Szczepy *A. vinelandii* DJ są również znane z produkcji różnych sideroforów katecholowych [13, 85]. Z kolei w genomie *A. chroococcum* NCIMB 8003 nie wykryto genów odpowiadających genom *ent* *A. vinelandii* DJ, co świadczy o tym, że szczep ten nie wytwarza sideroforu typu katecholowego. Warto jednak zauważyć, że w genomach obu szczepów obecny jest wysoce konserwatywny zespół pięciu genów, wykazujących wysoki stopień homologii do genów operonu *pvsABCDE* odpowiedzialnych za syntezę sideroforu polihydroksykARBoksylanu, zwanego u *Vibrio parahaemolyticum* vibrioferyną [81]. Synteza azotobaktyny jest determinowana przez grupę 12 genów *pvd* o sumarycznej długości ok. 60 kb. W tej grupie genów występują geny kodujące: cztery nierybosomalne syntetazy peptydowe,

6-monoxygenazę ornityny, tioesterazę, transaminazę diaminomaślano-2-oksoglutaranową, receptor sideroforowy TonB, regulator transkrypcji z rodziny TauD/TfdA i czynnik głodu żelazowego PvdS [68].

Szczep *A. chroococcum* NCIMB 8003 nie wytwarza fluorescencyjnych sideroforów. Genom NCIMB 8003 zawiera jednak kilka zespołów genów potencjalnie zaangażowanych w produkcję sideroforów. Największy z nich (41 kb) obejmuje 19 genów chromosomalnych, kodujących białka, które prawdopodobnie biorą udział w tworzeniu sideroforu podobnego do piowerdyny. Klaster ten zawiera geny dla: czterech nierybosomalnych syntetaz peptydowych, syntazy poliketydowej, tioesterazy, dwóch transporterów wypływu, L-ornityno-5-monooxygenazy, dwóch zależnych od żelaza receptorów sideroforowych TonB i czynnika Sigma 70. Genom tej bakterii zawiera także dwa inne *loci*, które mogą być zaangażowane w syntezę sideroforów peptydowych. Jedna grupa 8 genów znajduje się na plazmidzie pAcX50f, a druga (10 genów) na chromosomie i koduje stosunkowo niewielką nierybosomalną syntetazę peptydową oraz kilka pomp wyrzutu (efflux pump), których komponenty wykazują najwyższy stopień identyczności sekwencji z pompami bakterii z gatunku *Pseudogulbenkia* (klasa  $\beta$ -*Proteobacteria*). Dwa geny, z których jeden koduje receptor sideroforowy podobny do TonB, wykazują najwyższy stopień identyczności sekwencji z genami *A. vinelandii* DJ [68].

#### 4. Podsumowanie

Bakterie z rodzaju *Azotobacter* są przedmiotem wielu badań prowadzonych zarówno w Polsce jak i za granicą. Zainteresowanie tymi bakteriami w dużej mierze związane jest z ich właściwościami, pozwalającymi na wykorzystywanie tych drobnoustrojów w rolnictwie. Dzięki zdolności do wiązania azotu atmosferycznego i udostępniania go roślinom wyższym w formie przyswajalnej, produkcji substancji stymulujących wzrost i rozwój roślin, a także zdolności do produkcji związków hamujących rozwój patogenów, są one wykorzystywane w produkcji doglebowych szczepionek bakteryjnych.

Ponadto, bakterie te są doskonałym wskaźnikiem żyzności gleby, dlatego często wykorzystywane są jako mikroorganizmy modelowe w wielu badaniach. Przez wiele lat identyfikacja tych bakterii opierała się na metodach hodowlanych. Rozwój technik molekularnych umożliwił precyzyjne klasyfikowanie i właściwe identyfikowanie omawianych drobnoustrojów. Obecnie taksonomia *Azotobacter* spp. opiera się na badaniach wielokierunkowych, które bazują na danych uzyskanych z analizy cech fenotypowych, genomowych, a także z analiz filogenetycznych. Poznanie i porównanie sekwencji genomów *A. chroococcum* NCIMB 8003

i *A. vinelandii* DJ przynosi wiele wartościowych informacji, jednocześnie nasuwa wiele pytań, na które odpowiedzi pozwoliłyby zrozumieć ewolucję, różnorodność i miejsce tych bakterii w środowisku. Poznanie sekwencji genomowych innych szczepów *A. chroococcum* i *A. vinelandii* z pewnością przyniosłoby wiele korzyści i pozwoliłoby pełniej określić strukturę i właściwości genomów tych bakterii. Niezbędne jest również poznanie sekwencji innych gatunków tego rodzaju, a zwłaszcza *A. paspali* (bakterii o właściwościach halofilnych).

#### Piśmiennictwo

- Ahemad M., Kibret M.: Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. *J. King Saud. Univ. Sci.* **26**, 1–20 (2014)
- Anzai Y., Kim H., Park J.Y., Wakabayashi H., Oyaizu H.: Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**, 1563–1589 (2000)
- Aquilanti L., Favilli F., Clementi F.: Comparison of different strategies for isolation and preliminary identification of *Azotobacter* from soil samples. *Soil Biol. Biochem.* **36**, 1475–1483 (2004)
- Aquilanti L., Mannazzu I., Papa R., Cavalca L., Clementi F.: Amplified ribosomal DNA restriction analysis for the characterization of *Azotobacteraceae*: a contribution to the study of these free-living nitrogen-fixing bacteria. *J. Microbiol. Methods.* **57**, 197–206 (2004)
- Azcon R., Barea J.M.: Synthesis of auxin, gibberellins and cytokinins by *Azotobacter vinelandii* and *Azotobacter beijerinckii* related to effects produced on tomato plants. *Plant Soil.* **43**, 609–619 (1975)
- Bag P.B., Bappa Paramanik P.P., Ashok Choudhury B.M.: Atmospheric nitrogen fixing capacity of *Azotobacter* Isolate from Cooch Behar and Jalpaiguri Districts Soil of West Bengal, India. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* **6**, 1775–1788 (2017)
- Baj J.: Metabolizm (w) *Biologia molekularna bakterii*, red. J. Baj, Z. Markiewicz, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2007, s. 141
- Becking J.H.: The family *Azotobacteraceae* (w) *The Prokaryotes*, red. M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.H. Schleifer, E. Stackebrandt, Springer, New York, 2006, p. 759–783
- Behl R., Narula N., Vasudeva M., Sato A., Shinano T., Osaki M.: Harnessing wheat genotype X *Azotobacter* strain inter-actions for sustainable wheat production in semi arid tropics. *Tropics*, **15**, 121–133 (2006)
- Beijerinck M.W.: Über ologonitrophile mikroben. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. II Abt.* **9**, 561–582 (1901)
- Brown M., Walker N.: Indolyl-3-acetic acid formation by *Azotobacter chroococcum*. *Plant Soil.* **72**, 250–253 (1970)
- Clementi F.: Alginate production by *Azotobacter vinelandii*. *Crit. Rev. Biotechnol.* **17**, 327–361 (1997)
- Cornish A.S., Page W.J.: The catecholate siderophores of *Azotobacter vinelandii*: their affinity for iron and role in oxygen stress management. *Microbiology*, **144**, 1747–1754 (1998)
- Dalton H., Postgate J.R.: Effect of oxygen on the growth of *Azotobacter chroococcum* in batch and continuous culture. *J. Gen. Microbiol.* **54**, 463–473 (1968).
- Dalton H., Postgate J.R.: Growth and Physiology of *Azotobacter chroococcum* in continuous culture. *J. Gen. Microbiol.* **56**, 307–319 (1969).
- Demange P., Wendenbaum S., Bateman A., Dell A., Meyer J.M., Abdallah M.A.: Bacterial siderophores: structures of pyover-



- dins and related compounds (w) Iron, Siderophores, and Plant Diseases, red. T.R. Swinburne, Plenum Press, New York, 1986, p. 131–147
17. Döbereiner J.: *Azotobacter paspali* sp. nov., umabactéria fixadora de nitrogênio na rizosfera de Pas-palum. *Pesq. Agropec. Bras.* **1**, 357–365 (1966)
  18. Döbereiner J.: Non-symbiotic nitrogen fixation in tropical soils. *Pesq. Agropec. Bras.* **3**, 1–6 (1968)
  19. Döbereiner J.: Isolation and identification of aerobic nitrogen-fixing bacteria from soil and plants (w) *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*, red. K. Alef, P. Nannipieri, Academic Press, London, 1995, p. 134–141
  20. Drozd J., Postgate J.R.: Effects of oxygen on acetylene reduction, cytochrome content and respiratory activity of *Azotobacter chroococcum*. *J. Gen. Microbiol.* **63**, 63–73 (1970)
  21. El-Essawy A.A., El-Sayed M.A., Mohamed Y.A.: Production of cyanocobalamin by *Azotobacter chroococcum*. *Zentralblatt für Mikrobiologie*, **139**, 335–342 (1984)
  22. Gacesa P.: Bacterial alginate biosynthesis – recent progress and future prospects. *Microbiology*, **144**, 1133–1143 (1998)
  23. Gonzales-Lopez J., Martinez Toledo M.V., Reina S., Salmeron V.: Root exudates of maize on production of auxins, gibberellins, cytokinins, amino acid and vitamins by *Azotobacter chroococcum* chemically defined media and dialysed soil media. *Toxicol. Environ. Chem.* **33**, 69–78 (1991)
  24. Howey R.T., Lock C.M., Moore L.V.H.: Subspecies names automatically created by Rule 46. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **40**, 317–319 (1990)
  25. Hussain A., Arshad M., Hussain A., Hussain E.: Response of maize (*Zea mays*) to *Azotobacter* inoculation under fertilized and unfertilized conditions. *Biol. Fert. Soils.* **4**, 73–77 (1987)
  26. Jelsbak L., Johansen H.K., Frost A.L., Thøgersen R., Thomsen L.E., Ciofu O. i in.: Molecular epidemiology and dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* populations in lungs of cystic fibrosis patients. *Infect. Immun.* **75**, 2214–2224 (2007)
  27. Jensen V., Petersen E.J.: Taxonomic studies on *Azotobacter chroococcum* Beijerinck and *Azotobacter beijerinckii* Lipman. *J. R. Vet. Agric. Coll.* **84**, 107–126 (1995)
  28. Jiménez D.J., Montaña J.S., Martínez M.M.: Characterization of free nitrogen fixing bacteria of the genus *Azotobacter* in organic vegetable-grown Colombian soils. *Brazilian Journal of Microbiology*, **42**, 846–858 (2011)
  29. Jin H., Wang H., Zhang Y., Hu T., Lin Z., Liu B., Ma J., Wang X., Liu Q., Lin, X., Xie Z.: Description of *Azotobacter chroococcum* subsp. *isscasi* subsp. nov. isolated from paddy soil and establishment of *Azotobacter chroococcum* subsp. *chroococcum* subsp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **70**, 2124–2131 (2020)
  30. Kelly M.: The kinetics of the reduction of isocyanides, acetylenes and the cyanide ion by nitrogenase preparations from *Azotobacter chroococcum* and the effects of inhibitors. *Biochem. J.* **107**, 1–6 (1968)
  31. Kelly M.: Some properties of purified nitrogenase of *Azotobacter chroococcum*. *Biochim. Biophys. Acta*, **171**, 9–22 (1969)
  32. Kennedy C.J., Toukdarian A.: Genetics of *Azotobacters*: applications to nitrogen fixation and related aspects of metabolism. *Ann. Rev. Microbiol.* **41**, 227–258 (1987)
  33. Kennedy I.R., Choudhury A.T.M.A., Kecskés M.L.: Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? *Soil Biol. Biochem.* **36**, 1229–1244 (2004)
  34. Kennedy C.J., Rudnick P., MacDonald M.L., Melton T.: Genus III. *Azotobacter* Beijerinck 1901 (w) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: 2: Part B The Gammaproteobacteria*, red. G. Garrity, D.J. Brenner, N.R. Kreig, J.R. Staley, Springer, New York, London, 2007 s. 385–409
  35. Kennedy C., Dean D.R., Goodner B., Goldman B., Setubal J., Slater S., Wood D.: Full genome sequence of *Azotobacter vinelandii*: preliminary analysis (w) *Biological Nitrogen Fixation: Towards Poverty Alleviation through Sustainable Agriculture*, red. F.D. Dakora, S.B.M. Chimphango, A.J. Valentine, C. Elmerich, W.E. Newton, Springer Science+Business Media B.V., 2008, p. 297–298
  36. Kennedy C., Rudnick P.L.: *Azotobacter* (w) *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, red. W.B. Whitman, F. Rainey, P. Kämpfer, M.E. Trujillo, J. Chun, Hoboken, Wiley, 2015, p. 1–33
  37. Khosravi H., Dolatabad H.K.: Identification and molecular characterization of *Azotobacter chroococcum* and *Azotobacter salinestris* using ARDRA, REP, ERIC, and BOX. *Molecular Biology Reports*, **47**, 307–316 (2020)
  38. Kizilkaya R.: Yield response and nitrogen concentrations of spring wheat (*Triticum aestivum*) inoculated with *Azotobacter chroococcum* strains. *J. Ecol. Eng.* **3**, 150–156 (2008)
  39. Krasil'nikov N.A.: *Guide to the bacteria and actinomycetes*, red. Akademia Nauk SSSR, Moscow, 1949.
  40. Krawczyk B.: Diagnostyka molekularna w zakażeniach szpitalnych. *Post. Mikrobiol.*, **46**, 367–378 (2007)
  41. Lenart A.: Occurrence, characteristics, and genetic diversity of *Azotobacter chroococcum* in various soils of southern Poland. *Pol. J. Environ. Stud.* **21**, 415–424 (2012)
  42. Lenart-Boroń A.M., Wolny-Koładka K.A., Boroń P.M., Mitka J.R.: The molecular marker-based comparison of *Azotobacter* spp. populations isolated from industrial soils of Cracow-Nowa Huta steelworks (southern Poland) and the adjacent agricultural soils. *J. Environ. Sci. Health, Part A*, **49**, 1054–1063 (2014).
  43. Lipman J.G.: Experiments on the transformation and fixation of nitrogen by bacteria. *Report on the New Jersey Agricultural Experiment Station*, **24**, 217–285 (1903)
  44. Lipman J.G.: Soil bacteriological studies. Further contributions to the physiology and morphology of members of the *Azotobacter* group. *Report on the New Jersey Agricultural Experiment Station*, **25**, 237–289 (1904)
  45. Liu L., Yuan T., An Q., Yang M., Mao X., Mo C., Tan Z., Peng G.: *Azotobacter bryophylli* sp. nov., isolated from the succulent plant *Bryophyllum pinnatum*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **69**, 1986–1992 (2019)
  46. Maia M., Sanchez J.M., Vela G.R.: Plasmids of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* **170**, 1984–1985 (1988)
  47. Martinez Toledo M.V., Moreno J., De la Rubia T., Gonzalez-Lopez J.: Root exudates of *Zea mays* and production of auxins, gibberellins and cytokinins by *Azotobacter chroococcum*. *Plant Soil.* **110**, 149–152 (1989)
  48. Martyniuk S., Martyniuk M.: Occurrence of *Azotobacter* spp. in some Polish soils. *Pol. J. Envir. Stud.*, **12**, 371–374 (2003)
  49. Martyniuk S.: Znaczenie procesu biologicznego wiązania azotu atmosferycznego w rolnictwie ekologicznym. *J. Res. Appl. Agric. Eng.* **53**(4), 9–14 (2008)
  50. Marwa S. Abdel-Hamid, Elbaz A.F., Ragab A.A., Hamza H.A., El Halafawy K.A.: Identification and characterization of *Azotobacter chroococcum* isolated from some Egyptian soils. *J. Agric. Chem. and Biotechn.* **1**, 93–104 (2010).
  51. Mazinani Z., Asgharzadeh A.: Genetic diversity of *Azotobacter* strains isolated from soils by amplified ribosomal DNA restriction analysis. *Cytol. Genet.* **48**, 293–301 (2014)
  52. Neilands J.B.: Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *J. Biol. Chem.* **45**, 26723–26726 (1995)
  53. Noar J.D., Bruno-Bárcena J.M.: *Azotobacter vinelandii*: the source of 100 years of discoveries and many more to come. *Microbiology*, **164**, 421–436 (2018)

54. Obele I.I., Danladi M.M., Akwashiki O., Owuna G., Peter O.E., Obiekezie S., Paul T., Kenneth E.I., Olokunle A.A.: Isolation, identification and screening for nitrogen fixing activities by *Azotobacter chroococcum* isolated from soil of Keffi, Nigeria as agent for bio-fertilizer production. *Frontiers in Environmental Microbiology*, **5**, 70–76 (2019)
55. Özen A.I., Ussery D.W.: Defining the *Pseudomonas* genus: where do we draw the line with *Azotobacter*? *Microb. Ecol.* **63**, 239–248 (2012)
56. Page W., Shivprasad S.: *Azotobacter salinestrus* sp. nov., a sodium-dependent, microaerophilic, and aeroadaptive nitrogen-fixing bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41**, 369–376 (1991)
57. Page W.J., Tindale A., Chandra M., Kwon E.: Alginate formation in *Azotobacter vinelandii* UWD during stationary phase and the turnover of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate. *Microbiology*, **147**, 483–490 (2001)
58. Palleroni N.J.: Genus I. *Pseudomonas* Migula 1894, 237<sup>Al</sup> (w) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, red. D.J. Brenner, N.R. Krieg, J.T. Staley, G.M. Garrity, D.R. Boone, P. Vos i in., Sprinber, Boston, 2005
59. Paul E.A., Clark F.E.: Mikrobiologia i biochemia gleb, red. M. Jędrych, Wydawnictwo Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin, 2000, s. 400
60. Peciña A., Pascual A., Paneque A.: Cloning and expression of the *algL* gene, encoding the *Azotobacter chroococcum* alginate lyase: purification and characterization of the enzyme. *J. Bacteriol.* **181**, 1409–1414 (1999)
61. Pettinari M.J., Vazquez M.J., Silberschmidt D., Rehm B., Steinhel A., Mendez B.S.: Poly (3-hydroxybutyrate) synthesis genes in *Azotobacter* sp. strain FA8. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 5331–5334 (2001)
62. Ramos J.L., Robson R.L.: Lesions in citrate synthase that affect aerobic nitrogen fixation by *Azotobacter chroococcum*. *J. Bacteriol.* **162**, 746–751 (1985)
63. Rankin D.J., Rocha E.P.C., Brown S.P.: What traits are carried on mobile genetic elements and why? *Heredity*, **106**, 1–10 (2011)
64. Rediers H., Vanderleyden J., De Mot R.: *Azotobacter vinelandii*: A *Pseudomonas* in disguise? *Microbiology*, **150**, 1117–1119 (2004)
65. Robson R.L.: Characterization of an oxygen-stable nitrogenase complex isolated from *Azotobacter chroococcum*. *Biochem. J.* **181**, 569–575 (1979)
66. Robson R.L., Eady R.R., Richardson T.H., Miller R.W., Hawkins M., Postgate J.R.: The alternative nitrogenase of *Azotobacter chroococcum*, is a vanadium enzyme. *Nature*, **322**, 388–390 (1986)
67. Robson R.L., Woodley P.R., Pau R.N., Eady R.R.: Structural genes for the vanadium nitrogenase from *Azotobacter chroococcum*. *EMBO J.* **8**, 1217–1224 (1989)
68. Robson R.L., Jones R., Robson R.M., Schwartz A., Richardson T.H.: *Azotobacter* Genomes: The Genome of *Azotobacter chroococcum* NCIMB 8003 (ATCC 4412). *PLOS ONE*, **10**, 1–35 (2015)
69. Rubio E.J., Montecchia M.S., Tosi M., Cassán F.D., Perticari A., Correa O.S.: Genotypic characterization of *Azotobacteria* isolated from Argentinean soils and plant-growth-promoting traits of selected strains with prospects for biofertilizer production. *Sci. World. J.*, 1–12 (2013)
70. Salmeron V., Martinez Toledo M.V., Gonzalez-Lopez J.: Nitrogen fixation and production of auxins, gibberellins and cytokinin by *Azotobacter chroococcum* strain isolated from root of *Zea mays* in presence of insoluble phosphate. *Chemosphere*, **20**, 417–422 (1990)
71. Saude N., Cheze-Lange H., Beunard D., Dhulster P., Guillochon D., Caze A.M., Morcellet M., Junter G.A.: Alginate production by *Azotobacter vinelandii* in a membrane bioreactor. *Process Biochem.* **38**, 273–278 (2002)
72. Segura D., Cruz T., Espin G.: Encystment and alkylresorcinol production by *Azotobacter vinelandii* strains impaired in poly-beta-hydroxybutyrate synthesis. *Arch. Microbiol.* **179**, 4370–443 (2003)
73. Setubal J.C., Wood D. i wsp.: Genome sequence of *Azotobacter vinelandii*, an obligate aerobe specialized to support diverse anaerobic metabolic processes. *J. Bacteriol.* **191**, 4534–4545 (2009)
74. Setubal J.C., Almeida N.F.: The *Azotobacter vinelandii* genome: an update (w) Biological Nitrogen Fixation vol.1, red. B.J. de Bruijn, John Wiley & Sons, New Jersey, 2015, p. 225–234.
75. Shapiro J.A.: Transposable elements as the key to a 21<sup>st</sup> century view of evolution. *Genetica*, **107**, 171–179 (1999)
76. Skerman V.B.D., McGowan V., Sneath P.H.A.: Approved Lists of bacterial names. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **30**, 225–420 (1980)
77. Smith N.R.: The occurrence of a strain of *Azotobacter chroococcum* which does not ferment mannitol. *J. Bacteriol.* **30**, 323–328 (1935)
78. Steinberg R.A.: Applicability of nutrient-solution purification to the study of trace-element requirements of *Rhizobium* and *Azotobacter*. *J. Agric. Res.* **57**, 461–476 (1938)
79. Stevenson L.H., Socolofsky M.D.: Cyst formation and poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid accumulation in *Azotobacter*. *J. Bacteriol.* **91**, 304–310 (1966)
80. Stockdale H., Ribbons D.W., Dawes E.A.: Occurrence of poly-beta hydroxybutyrate in the Azotobacteraceae. *J. Bacteriol.* **95**, 1798–803 (1968)
81. Tanabe T., Funahashi T., Nakao H., Miyoshi S., Shinoda S., Yamamoto S.: Identification and characterization of genes required for biosynthesis and transport of the siderophore vibrioferrin in *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Bacteriol.* **185**, 6938–6949 (2003)
82. Tchan Y.T., New P.B.: *Azotobacteraceae* (w) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 1, red. Kreig N.R., Holt J.G., Williams and Wilkins, Baltimore, 1984, s. 220–229
83. Tejera N., Lluch C., Martinez-Toledo M.V., Gonzalez-Lopez J.: Isolation and characterization on *Azotobacter* and *Azospirillum* strains from the sugarcane rhizosphere. *Plant Soil.* **270**, 223–232 (2005)
84. Thompson J.P., Skerman V.B.D.: *Azotobacteraceae*: The Taxonomy and Ecology of the Aerobic Nitrogen-Fixing Bacteria. Academic Press London, New York, Toronto, Sydney, San Francisco, 1979
85. Tindale A.E., Mehrotra M., Ottem D., Page W.J.: Dual regulation of catechol siderophore biosynthesis in *Azotobacter vinelandii* by iron and oxidative stress. *Microbiology*, **146**, 1617–1626 (2000)
86. Torrents E.: Ribonucleotide reductases: essential enzymes for bacterial life. *Frontiers Cell Infect Microbiol.* **4**, 1–9 (2014)
87. Touchon M., Rocha E.P.C.: The small, slow and specialised CRISPR and anti-CRISPR of *Escherichia* and *Salmonella*. *PLOS ONE*, **5**, 1–14 (2010)
88. Yan Y., Yang J., Dou Y., Chen M., Ping S., Peng J. i in.: Nitrogen fixation island and rhizosphere competence traits in the genome of root-associated *Pseudomonas stutzeri* A1501. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **105**, 7564–7569 (2008)
89. Yates MG, Planqué K.: Nitrogenase from *Azotobacter chroococcum*. *Eur. J. Biochem.* **60**, 467–476 (1975)
90. Young J.M., Park D.C.: Probable synonymy of the nitrogen-fixing genus *Azotobacter* and the genus *Pseudomonas*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**, 2894–2901 (2007)
91. Zhang Y., Rodionov D.A., Gelfand M.S., Gladyshev V.N.: Comparative genomic analysis of nickel, cobalt and vitamin B12 utilization. *BMC Genomics*, **10**, 78 (2009)