



7. Ulyanov S. Principles of high-resolution speckle microscopy: analysis of bioflows // Proc SPIE. 2002. Vol.4607. P.374–380.

8. Ульянова О.В., Ганилова Ю.А., Ульянов С.С. Использование спекл-микроскопии при тестировании токсичности бактериальных препаратов // Вестн. Саратов. гос. аграрного ун-та. 2007. №2. С.18–20.

9. Инфекционные болезни и эпидемиология: Учебник / В.И. Покровский, С.Г. Пак, Н.И. Брико, Б.К. Данилкин. 2-е изд. М.: ЭОТАР-МЕД, 2004. 816 с.

10. Волкова М.В. Разработка экспериментальной живой вакцины для профилактики колибактериоза свиней: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Саратов, 2006.

11. Мельников Н.И., Мельников В.Н., Гимранов М.Г. Ферменты патогенности и токсины бактерий. М.: Медицина, 1969. 252 с.

12. Зайчик А.Ш., Чурилов Л.П. Основы общей патологии: Учеб. пособие для студентов медвузов. СПб.: ЭЛБИ, 1999. Ч.1. Основы общей патофизиологии. 624 с.

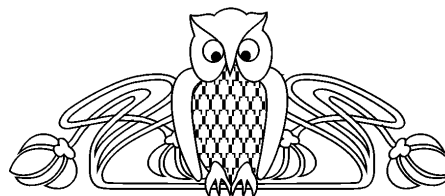
УДК 579.835:57.083.334

ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИГЕННЫХ СВОЙСТВ ПОЧВЕННЫХ РОСТ-СТИМУЛИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ РОДА *AZOSPIRILLUM*

Ю.А. Чернова, Г.Л. Бурьгин*

Саратовский государственный университет,
кафедра микробиологии и физиологии растений
E-mail: biofac@sgu.ru

* Лаборатория иммунохимии ИБФРМ РАН



Азоспириллы способны непосредственно или косвенно стимулировать рост растений и повышать урожайность ряда видов растений. Антигенное разнообразие видов рода *Azospirillum* обусловлено структурными различиями ЛПС О-антигена. Серологический скрининг 38 штаммов азоспирилл позволил выделить три серотипа, включающие восемь серовариантов, по наличию антигенных перекрестов с модельными штаммами. В отдельную группу были отнесены 7 штаммов, так как взаимодействовали только с родоспецифичными антителами. Установлено сходство антигенных свойств ЛПС штаммов азоспирилл, выделенных с разных видов растений.

Ключевые слова: *Azospirillum*, О-антиген, антигенные свойства, серотипирование.

A Study of Antigenic Properties of Soil Plant-Growth-Promotion Bacteria Genus *Azospirillum*

Yu.A. Chernova, G.L. Burygin

Azospirillum can directly or indirectly stimulate growth of plants and improve yield of at least several plant species. Structural distinctions LPS O-antigen determinate antigen variations *Azospirillum* species. Thirty eight strains of *Azospirillum* were screening. The fact that most research strains demonstrated cross-reactions with model strains underlie the division into three serotypes, including eight serovariants. Seven strains demonstrated cross-reactions only with genus-specific antibodies and have been separated into individual group. It has been indicated antigen similarity LPS strains of *Azospirillum* from different plant species.

Key words: *Azospirillum*, O-antigen, antigen properties, serotypes.

Введение

В последнее время серологические методы широко применяются при изучении взаимоотношений растений и микроорганизмов. В литературе встречается много данных по серологическому исследованию фитопатогенных бактерий и представителей клубеньковых азотфиксаторов рода *Rhizobium*. Число работ, посвященных исследованию азотфиксирующих бактерий, колонизирующих небобовые растения, в частности бактерий рода *Azospirillum*, незначительно.

К роду *Azospirillum* относятся рост-стимулирующие ризобактерии, которые могут способствовать развитию растений как непосредственно (азотфиксация, гормональный эффект, улучшение минерального и водного питания растений), так и опосредованно, путем подавления развития растительных патогенов [1, 2]. В последнее время азоспириллы рассматриваются как перспективный член консорциума ризобактерий для инокуляции в качестве бактериальных удобрений. Важным является то, что штаммы одного вида, отличающиеся по своим антиген-



ным характеристикам, могут с разной степенью интенсивности взаимодействовать с растением [3, 4].

Антигенное разнообразие бактерий рода *Azospirillum* обусловлено, в первую очередь, структурными различиями ЛПС О-антигена (О-Аг) их наружной мембраны. О-антигены определяют иммунохимическую специфичность штаммов азоспирилл, что служит основой для их внутривидовой классификации. Построение на основе серологических признаков схемы идентификации рода *Azospirillum* облегчит процесс отбора более эффективных штаммов азоспирилл в образовании ассоциативных связей с растительными партнёрами. Целью данной работы было проведение анализа разнообразия О-Аг штаммов азоспирилл, необходимого в дальнейшем для построения схемы серотипирования данных бактерий.

Материалы и методы исследований

Объектом для исследования явились 38 штаммов бактерий рода *Azospirillum* из коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН, 28 из которых были выделены в Саратовской области. Бактерии выращивали при 30°C на жидкой и плотной синтетической малатной среде [5].

Для иммунохимических экспериментов препараты ЛПС (О-Аг) получали модифицированным методом экстракции ЭДТА-содержащим буфером [6].

В работе использовали антитела (Ат) на обработанные 2%-ным раствором глutarового альдегида (ГА) клетки модельных штаммов *A. brasilense* [7]: Sp7 (Ат 1), Sp245 (Ат 2), JM125A2 (Ат 3); антитела на хроматографически очищенный ЛПС *A. brasilense* S-17 (Ат 4) [8] и родоспецифичные Ат, полученные на интактные клетки *A. brasilense* Cd (Ат 5). Иммуноглобулины были выделены из гипериммунных кроличьих сывороток по общепринятой методике [7].

Взаимодействие ЛПС азоспирилл с антителами оценивали методом радиальной иммунодиффузии в 1%-ном агарозном геле, с последующей окраской Кумасси R-250 [9].

Результаты и их обсуждение

В результате проведенных исследований было установлено, что все 38 штаммов бактерий рода *Azospirillum* взаимодействовали с родоспецифичными Ат 5 (таблица). Это свидетельствует о высокой консервативности белковых антигенов азоспирилл, а также о возможности использования антител на интактные бактериальные клетки для родовой идентификации.

Результаты серотипирования штаммов *A. brasilense* по структуре О-Аг

Серотип	Серовариант	Характеристика сероварианта*					Штаммы, относящиеся к сероварианту
		Ат 1	Ат 2	Ат 3	Ат 4	Ат 5	
I	A	+	-	-	++	+	<i>A. brasilense</i> : SR 80, Sp 7
	B	+	-	-	+	+	<i>A. brasilense</i> SR 55
	C	+	-	-	-	+	<i>A. brasilense</i> SR 14
II	D	-	++	-	+	+	<i>A. brasilense</i> : SR 75, Sp107, Sp245
	E	-	+	-	+	+	<i>Azospirillum</i> sp SR 81 <i>A. brasilense</i> S-27
	F	-	++	-	-	+	<i>A. brasilense</i> SR 15
III	G	-	-	+	+	+	<i>A. brasilense</i> : JM125A2, JM6B2, Sp 246
	H	-	-	+	++	+	<i>A. brasilense</i> SR 32
	I	-	-	+	-	+	<i>A. brasilense</i> KR 77, SR 115
Штаммы, не отнесенные к выделенным серотипам	J	-	-	-	+	+	<i>A. brasilense</i> : SR 7, SR 37, SR 57, SR 88, SR 92, SR 96, SR 100, SR 103, S-17 <i>Azospirillum</i> sp.: SR 59, SR 74, SR 120
	K	-	-	-	++	+	<i>A. brasilense</i> : SR 50, SR 56, SR111, SR87; <i>Azospirillum</i> sp.: SR 79,
	L	-	-	-	-	+	<i>A. brasilense</i> : SR 8, SR 64, SR 72, SR 41, BR 14

*Антитела на обработанные ГА клетки: *A. brasilense* Sp 7 (Ат 1), *A. brasilense* Sp245 (Ат 2), *A. brasilense* JM125A2 (Ат 3); антитела на хроматографически очищенный ЛПС *A. brasilense* S-17 (Ат 4), антитела на интактные клетки *A. brasilense* Cd (Ат 5).



Для 14 штаммов выявлены перекрёстные серологические реакции с антителами только к одному из модельных штаммов (*A. brasilense* Sp7, *A. brasilense* Sp245, *A. brasilense* JM125A2), полученными на клетки бактерий, обработанные ГА (Ат 1, Ат 2 или Ат 3). В результате было выделено три серотипа. Каждый серотип, в свою очередь, можно разделить на сероварианты, во-первых, в зависимости от количества (1 или 2) полос преципитации, которые данные штаммы образовывали с антителами к соответствующему модельному штамму, во-вторых, в зависимости от наличия полос преципитации с антителами к ЛПС *A. brasilense* S-17 (Ат 5) (см. таблицу).

Из изученных штаммов *Azospirillum* 17 давали серологическую реакцию только с Ат 4 и не взаимодействовали с антителами к модельным штаммам. Данный факт требует дальнейшего изучения.

Пять штаммов азоспирилл (*A. brasilense*: SR 8, SR 64, SR 72, SR 41, BR 14) взаимодействовали только с родоспецифичными антителами и не имели общих антигенных структур с модельными штаммами и с хроматографически очищенными вариантами антигенов по данным наших серологических исследований. Это свидетельствует, возможно, о более широком разнообразии антигенных свойств О-антигенов данных бактерий.

Полученные результаты демонстрируют насколько велико разнообразие антигенных детерминант азоспирилл. Следует отметить, что некоторые штаммы, выделенные с растений одного вида, были отнесены в разные серотипы. И наоборот, были штаммы, выделенные с разных видов растений, которые проявляли сходные антигенные свойства, что позволило отнести их в один серовариант. Полученные экспериментальные данные имеют существенное значение для построения схемы идентификации бактерий рода *Azospirillum* в дальнейшем. При более де-

тальном изучении, возможно, будет пересмотрено серологическое положение различных штаммов азоспирилл.

Выражаем благодарность доктору биологических наук Л.Ю. Матора за предоставление антител, использованных в работе, и сотрудникам лаборатории биохимии ИБФРМ РАН кандидату биологических наук О.Н. Конновой и кандидату биологических наук Ю.П. Федоненко.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы Президента РФ по поддержке научных школ (грант НШ-6177.2006.4).

Библиографический список

1. Bashan Y., Holguin G. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990–1996) // Can. J. Microbiol. 1997. Vol.43. P.103–121.
2. Albrecht S.L., Okon Y., Lonnquist L., Burris R.H. Nitrogen fixation by corn-*Azospirillum* associations in a temperate climate // Crop. Sci. 1981. Vol.21. P.301–306.
3. Steenhoudt O., Vanderleyden J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects // FEMS Microbiol. Rev. 2000. Vol.24. P.487–506.
4. Ignatov V.V., Fendrik I., M. Del Gallo et al. Interaction between partners in association "Wheat-*Azospirillum brasilense* Sp245" // *Azospirillum* VI and Related Microorganisms. Berlin, 1995. P.271–278.
5. Döbereiner J., Day J.M. Associative symbiosis in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites // Proc. Intern. Symp. on N₂-Fixation. Washington, 1976. P.518–537.
6. Leive L., Shovlin V.K., Mergenhagen S.E. Physical, chemical and immunological properties of lipopolysaccharides released from *Escherichia coli* by ethylenediaminetetraacetate // J. Biol. Chem. 1968. Vol.243. P.6384–6391.
7. Bogatyrev V.A., Dykman L.A., Matora L.Yu., Schwartzburd B.I. The serotyping of *Azospirillum* spp. by cell-gold immunoblotting // FEMS Microb. Lett. 1992. Vol.96. P.115–118.
8. Коннова О.Н., Бурыгин Г.Л., Федоненко Ю.П. и др. Химический состав и иммунохимическая характеристика липополисахарида азотфиксирующих ризобактерий *Azospirillum brasilense* Cd // Микробиология. 2006. Т.75, №3. С.383–388.
9. Матора Л.Ю., Шварцбург Б.И., Щеголев С.Ю. Иммунохимический анализ О-специфических полисахаридов почвенных азотфиксирующих бактерий *Azospirillum brasilense* // Микробиология. 1998. Т.67, №6. С.815–820.