



17. Жолобова О. О. Сохранение редких и исчезающих видов растений в культуре *in vitro* и оценка уровня их внутривидового полиморфизма : автореф. дис. ... канд. биол. наук. Белгород : Изд-во БелГУ, 2012. 23 с.
18. Ишмуратова М. М. Сохранение *Stemmacanta ser-*

ratuloides ex situ // Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира : материалы II Всерос. науч.-практ. конф., Волгоград, 19–21 авг. 2008 г. / под ред. А. С. Демидова. Белгород : Изд-во БелГУ, 2008. С. 60–63.

УДК 579.242:579.841.2

ОСОБЕННОСТИ ВЫЖИВАНИЯ РИЗОБАКТЕРИИ *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* SP245 В ЖИДКОЙ КУЛЬТУРЕ ПРИ БОЛЬШИХ СРОКАХ ХРАНЕНИЯ

М. А. Кушнерук¹, Е. А. Славкина², Н. И. Старичкова², Л. П. Антонюк¹

¹Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов
E-mail: ant306@ibppm.sgu.ru

²Саратовский государственный университет
E-mail: natstar-12@mail.ru



Изучали особенности выживания неспорообразующей ризобактерии *Azospirillum brasilense* Sp245 в жидкой культуре при ее хранении в течение 6 лет 8 мес., а также возобновление размножения при внесении покоящихся бактерий в свежую среду. Установлено, что на протяжении всего периода наблюдения азоспириллы сохраняют достаточно высокое (не менее 10³ кл./мл) число клеток, не утративших способности к делению. Выявлено образование флокулодержательной биопленки бентосного типа, сохранявшейся до конца наблюдения, а также кристаллов игольчатой формы. Показано, что бактериальные клетки в длительно хранящейся культуре *A. brasilense* сохраняют высокий ростовой потенциал и быстро возобновляют рост при перенесении в свежую синтетическую среду. Присутствие в свежей среде белка АЗП в концентрации 1 нг/мл стимулировало размножение бактерий. Полученные результаты, наряду с более ранними сведениями о высоком ростстимулирующем потенциале азоспирилл, свидетельствуют о перспективности создания жидких препаратов для растениеводства на основе *A. brasilense*.

Ключевые слова: *Azospirillum brasilense*, покой у бактерий, биопленка, агглютинин зародышей пшеницы, АЗП, длительное хранение культур, кристаллы.

Features of the Rhizobacterium *Azospirillum brasilense* Sp245 Long-term Survival in Liquid Culture

М. А. Kushneruk, E. A. Slavkina,
N. I. Starichkova, L. P. Antonyuk

Features of the survival of non-spore forming rhizobacteria *Azospirillum brasilense* Sp245 in liquid culture at its storage for 6 years 8 months, as well as the revert to growth when dormant bacteria incubated in fresh medium were studied. During the entire period of observation azospirilla were established to retain rather high (at least 10³ cells/ml) the number of cells which have not lost the ability to divide. A flocs-containing biofilms of benthic type persisted until the end of observation and needle-shaped crystals were found. It has been

shown that bacterial cells in the long-term *A. brasilense* culture retain a high growth potential and rapidly resume growth when transferred to fresh synthetic medium. The presence of the protein 1 ng/ml WGA in the fresh medium was stimulated proliferation of bacteria. The obtained results, together with earlier information on high growth-stimulating potential of azospirilla, indicate the prospects of creating a liquid preparations for crop based on *A. brasilense*.

Key words: *Azospirillum brasilense*, dormancy in bacteria, biofilm, lectin, wheat germ agglutinin, WGA, long-term culture, crystals.

Почти все известные штаммы *Azospirillum brasilense* относятся к функциональной группе ростстимулирующих ризобактерий (plant-growth promoting rhizobacteria – PGPR) в силу присущей им способности колонизировать агрономически значимые растения, улучшать их рост, защищать от патогенов и увеличивать урожайность [1–2]. Несмотря на очевидный биотехнологический потенциал азоспирилл и наличие на агрорынке препаратов на их основе, разработчики новых бактериальных препаратов при прочих равных условиях зачастую отдают предпочтение представителям родов *Bacillus* и *Paenibacillus* [3]. Основными причинами такого предпочтения являются способность бацилл к спорообразованию и их ожидаемая хорошая выживаемость при длительном хранении готовых биопрепаратов.

Азоспириллы относятся к неспорообразующим бактериям и при неблагоприятных условиях формируют цисты, близкие по строению к цистам *Azotobacter vinelandii* [4, 5]. Сохранение жизнеспособности *A. brasilense* при длительных сроках хранения уже изучалось, однако лишь для одного случая – когда бактерии заключены в альгинатные



гранулы [6]. Для жидких культур сроки наблюдения ограничиваются, как правило, несколькими месяцами; исключения при этом единичны [2, 7]. Тем не менее, вопрос о длительной персистенции (переживании неблагоприятных условий), в том числе и в жидких культурах, представляет в случае *A. brasilense* как практический, так и фундаментальный интерес. Азоспириллы имеют большой геном [8] и высокий адаптационный потенциал [4, 5, 9], что дает дополнительный стимул к изучению физиологических и молекулярных особенностей их адаптации.

Известно, что азоспириллы могут успешно заселять ризосферу только в том случае, когда к моменту появления корней они уже вышли из состояния покоя, перешли к активному делению и достигли высокой плотности популяции. В связи с этим представляет большой интерес вопрос о том, влияет ли растение-хозяин – например, через регуляторные вещества корневых выделений – на выход бактерий из состояния покоя. Опубликована гипотеза, в соответствии с которой агглютинин зародышей пшеницы (АЗП), один из компонентов корневых выделений, может быть индуктором возобновления роста ризобактерий при наступлении благоприятных условий [10]. Гипотеза о стимулирующем эффекте данного белкового фактора уже получила экспериментальное подтверждение для бактерии *Micrococcus luteus* [11], однако для симбионта пшеницы *A. brasilense* Sp245 – бактерии, компетентной к данному лектину [10, 12], экспериментальные данные по этому вопросу пока отсутствуют.

Целью работы было выяснение вопроса о сохранении жизнеспособности у *A. brasilense* Sp245 в естественном цикле старения в течение 5–6 лет и более, а также изучение особенностей возобновления роста после длительного хранения, в том числе в присутствии АЗП.

Материалы и методы

Объектом исследования был штамм *A. brasilense* Sp245 – природный симбионт пшеницы (*Triticum aestivum* L.), факультативный эндофит этого растения, дающий высокие прибавки урожая в полевых экспериментах [2]. Культуру (из коллекции ИБФРМ РАН, г. Саратов) пересевали в темные 1-литровые бутылки с синтетической малатной средой (СМС) [9], из которой был исключен источник связанного азота NH_4Cl . Бутылки укупоривали двумя пластиковыми крышками и хранили течение месяца при 31°C, затем – при комнатной температуре. За состоянием культуры, находящейся в естественном

цикле старения, наблюдали на протяжении 6 лет 8 месяцев.

Число жизнеспособных клеток определяли, используя стандартный тест учета колониеобразующих единиц (КОЕ) на агаризованной (2%) среде СМС. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре Spekol 221 (Carl Zeiss, Германия) при длине волны 595 нм.

Микробиологическую чистоту культур оценивали с использованием микроскопа Olympus (C011, Япония). Обнаруженные в культуре игольчатые кристаллы анализировали с помощью световой микроскопии для оценки их формы и длины (микроскоп Leica DM2500). Для фотографирования биопленки использовали цифровой фотоаппарат Sony DSC-W120.

Возобновление роста *A. brasilense* после длительной персистенции изучали, перенося бактерии в свежую жидкую среду СМС. Для оценки возможного влияния агглютинина зародышей пшеницы (АЗП) на переход азоспириллы от покоя к размножению добавляли этот лектин в жидкую среду после ее автоклавирования до конечной концентрации 1 или 9 нг/мл. В экспериментах по возобновлению роста использовали разный объем вносимого в свежую среду инокулята: 0.01; 0.05; 0.1; 0.5 и 10% (об.).

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием пакета программ Microsoft Office Excel 2003. Доверительные интервалы определяли для 95%-ного уровня значимости.

Результаты и их обсуждение

Как и ожидалось, клетки *A. brasilense* Sp245 в естественном цикле старения хорошо адаптировались к неростовым условиям. В культуре происходило образование двух различных фаз: часть бактерий оставалась во взвешенном (планктонном) состоянии, другая часть образовывала лежащий на дне сосуда пигментированный хлопьевидный осадок. Предполагали, что осадок представлен флокулами, так как флокулообразование в жидких средах – характерная особенность *A. brasilense*. Простейший анализ, включавший фотографирование донного осадка и просмотр цифровых снимков, показал, что с течением времени скопления флокул покрывались прозрачным студнеобразным матриксом (рис. 1). Таким образом, в естественном цикле старения у *A. brasilense* Sp245 происходило образование флокулодержательной биопленки бентосного типа, уже описанной для других микроорганизмов [13]; она сохранялась до конца наблюдения (около 7 лет).

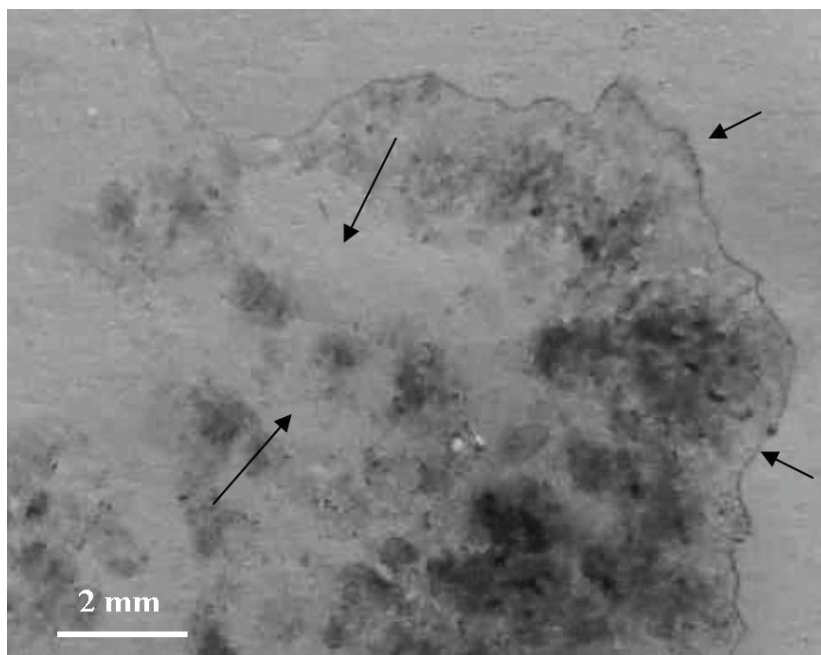


Рис. 1. Фотография флокулосодержащей биопленки *A. brasilense* Sp245. Возраст культуры 6 лет 8 мес. Короткими стрелками указан край биопленки, длинными – визуальнo прозрачная область (матрикс)

При тестировании жизнеспособности культуры с большими сроками хранения высевы делали из ее планктонной части. Как видно из представленных данных (таблица), бактерии неизменно сохраняли способность к возобновлению роста на свежей агаризованной среде;

в интервале от 3,5 лет до 6 лет 8 мес. число жизнеспособных клеток составляло не менее 1000 кл./мл. Важно было выяснить, достаточно ли такого количества клеток для быстрого возобновления роста при наступлении благоприятных условий.

Динамика снижения жизнеспособности культуры *A. brasilense* Sp245, выращенной в оптимальных условиях и хранящейся при комнатной температуре

Состояние жидкой культуры	Возраст	Число жизнеспособных клеток, КОЕ/мл
Вегетативная	18 ч	$(7.9 \pm 0.1) \times 10^8$
Персистирующая	2 г. 2 мес.	$(2.1 \pm 0.1) \times 10^4$
	3 г. 6 мес.	$(2.2 \pm 0.6) \times 10^3$
	5 лет 1 мес.	$(0.6 \pm 0.2) \times 10^3$
	5 лет 6 мес.	$(1.2 \pm 0.4) \times 10^3$
	6 лет 8 мес.	$(7.7 \pm 0.8) \times 10^3$

Примечание. Данные для двух культур, вегетативной и персистирующей в течение 2 лет и 2 месяцев, были представлены ранее [7].

С этой целью бактерии пересевали в свежую жидкую среду СМС, содержащую или не содержащую лектин пшеницы – АЗП. Было установлено, что азоспириллы на среде без лектина легко возобновляют рост не только при средних и высоких концентрациях инокулята, но и при очень низких – 0.01 и 0.05%. Даже в случае культуры возраста 6 лет 3 мес. и концентрации инокулята 0.01% бактерии при перенесении в свежую среду размножились: по-

степенно увеличивалась оптическая плотность (рис. 2). Для более полной оценки размножения бактерий в свежей среде в эксперименте определяли также количество жизнеспособных клеток в стандартном тесте КОЕ. Несмотря на то что в среду было внесено лишь небольшое количество покоящихся бактерий (концентрация инокулята составляла 0.01%), через 1 сут. регистрировалось 4×10^6 кл./мл, а через 2 сут. – 1.7×10^9 кл./мл.

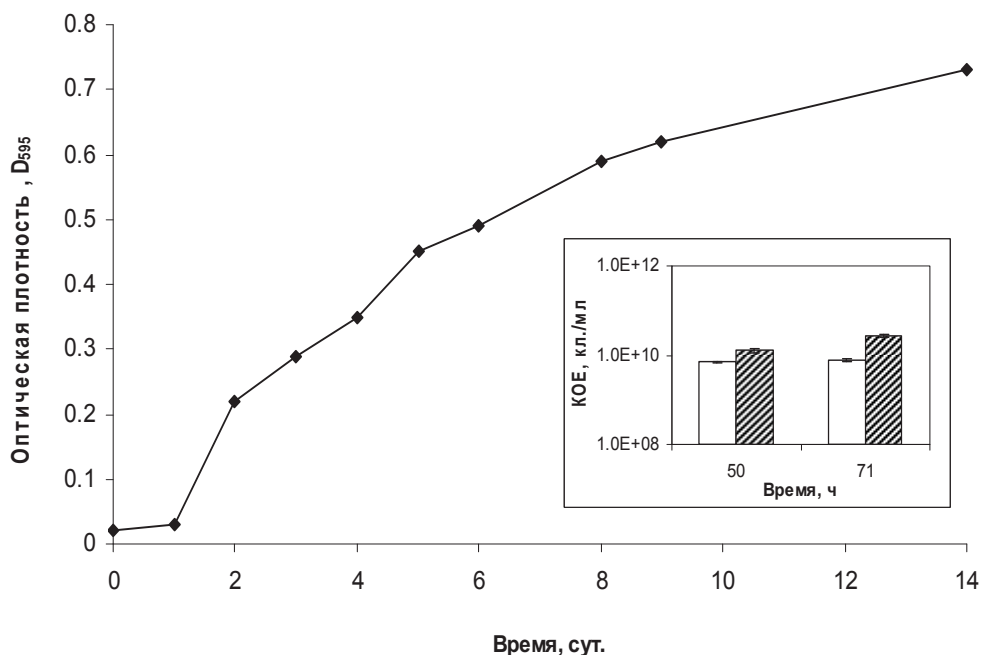


Рис. 2. Возобновление роста *A. brasilense* Sp245 на свежей среде СМС после персистенции в течение 6 лет 3 мес. На вклейке: Влияние АЗП на численность жизнеспособных клеток (КОЕ) в культуре *A. brasilense* Sp245, растущей в свежей среде СМС; белым цветом – контроль, штриховкой – АЗП, 1 нг/мл

Присутствие в среде лектина в концентрации 1 нг/мл стимулировало размножение азоспирилл, перенесенных в свежую среду (см. рис. 2, вклейка). В частности, число жизнеспособных клеток на среде с АЗП превышало контрольные значения: к 50 часам – в 1,8 раза, к 70 часам – в 3,5 раза и достигало 1.3×10^{10} и 2.7×10^{10} кл./мл, соответственно. Необходимо отметить, что в наших экспериментах стимулирующее влияние АЗП было не столь выраженным, как в случае вегетативных клеток *A. brasilense* [12] и покоящихся клеток *M. luteus* [11]. Этот факт, наряду с другими приведенными выше данными, позволяет предположить, что культуры *A. brasilense* в естественном цикле старения сохраняют не только достаточное число жизнеспособных клеток, но и собственные факторы роста, способствующие эффективному переходу азоспирилл к размножению при наступлении благоприятных условий. Нельзя исключить, что резервуаром жизнеспособных клеток и факторов роста является флокulosодержащая биопленка [13].

Ранее уже сообщалось об образовании биопленок при адсорбции клеток азоспириллы на поверхности стекла или пластика [14]; такая биопленка имеет однородную структуру и прикреплена к твердой поверхности. Нами описано присутствие в жидких культурах *A. brasilense* биопленки иного, бентосного типа: она не при-

креплена к твердой поверхности и всплывает при взмучивании культуры, и кроме того, имеет неоднородную структуру: состоит из флоккул и матрикса.

Световая микроскопия изучаемой культуры с возрастом более 6 лет выявляла также игольчатые кристаллы, идентичные по внешнему виду кристаллам, образующимся в иных условиях – персистенции отмытых от среды клеток *A. brasilense* Sp245 в физиологическом растворе, содержащем гексилрезорцин и CuSO_4 [9]. Вероятно, игольчатые кристаллы формируются в среде обитания *A. brasilense* Sp245 при глубоких и длительных стрессах различной природы, в то время как обнаруженные нами ранее у этого же штамма кристаллы струвита [15] образуются из компонентов среды СМС вегетативными клетками вне стресса. Химическая природа игольчатых кристаллов остается пока неизвестной.

Известно, что на рынке бактериальных препаратов для растениеводства имеются высокоэффективные жидкие препараты, в частности на основе *Bacillus subtilis* и некоторых других представителей функциональной группы PGPR. Представленные в данной работе результаты, наряду с более ранними сведениями о высоком ростстимулирующем потенциале азоспирилл, свидетельствуют о перспективности разработки аналогичных препаратов на основе *A. brasilense*.



Выводы

На примере биотехнологически перспективного штамма Sp245 показана способность *A. brasilense* к сохранению достаточно большого числа жизнеспособных бактериальных клеток в культуре (10^3 кл./мл и выше) в течение, по крайней мере, 6 лет 8 мес.

Адаптация *A. brasilense* к длительному хранению включает формирование флокулосодержащей биопленки бентосного типа.

Бактериальные клетки в длительно хранящейся культуре *A. brasilense* Sp245 сохраняют высокий ростовой потенциал и быстро возобновляют рост при внесении даже небольшого их количества в свежую синтетическую среду.

Лектин АЗП, являющийся компонентом корневых выделений пшеницы, стимулирует размножение симбионта растений пшеницы *A. brasilense* Sp245 при концентрации лектина в среде 1 нг/мл.

Авторы статьи выражают благодарность ведущему научному сотруднику, доктору биологических наук В. А. Богатыреву (ИБФРМ РАН) за помощь в микроскопии кристаллосодержащих препаратов.

Список литературы

1. *Fibach-Paldi S., Burdman S., Okon Y.* Key physiological properties contributing to rhizosphere adaptation and plant growth promotion abilities of *Azospirillum brasilense* // FEMS Microbiol. Lett. 2012. Vol. 326, № 1. P. 99–108.
2. *Russo A., Carrozza G. P., Vettori L., Felici C., Cincelli F., Toffanin A.* Plant Beneficial Microbes and Their Application in Plant Biotechnology // Innovations in Biotechnology / eds. Agho E. C. Rijeka. Croatia : InTech, 2012. P. 57–72.
3. *Kumar A., Prakash A., Johri B. N.* Bacillus as PGPR in Crop Ecosystem // Bacteria in Agrobiolgy : Crop Ecosystems / eds. D. K. Maheshwari. Berlin Heidelberg : Springer-Verlag, 2011. P. 37–59.
4. *Мулюкин А. Л., Сузина Н. Е., Погорелова А. Ю., Антонюк Л. П., Дуда В. И., Эль-Регистан Г. И.* Разнообразие морфотипов покоящихся клеток и условия их образования у *Azospirillum brasilense* // Микробиология. 2009. Т. 78, № 1. С. 42–51.
5. *Sadasivan L., Neyra C. A.* Cyst production and brown pigment formation in aging cultures of *Azospirillum brasilense* ATCC 29145 // J. Bacteriol. 1987. Vol. 169, № 4. P. 1670–1677.
6. *Bashan Y., Gonzalez L. E.* Long-term survival of the plant-growth-promoting bacteria *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens* in dry alginate inoculant // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1999. Vol. 51, № 2. P. 262–266.
7. *Ильчукова А. В., Тугарова А. В., Антонюк Л. П.* Изучение покоя у ризобактерий *Azospirillum brasilense* при длительном культивировании // Вестн. Саратов. агроун-та им. Н. И. Вавилова. 2010. № 2. С. 7–9.
8. *Kaneko T., Minamisawa K., Isawa T., Nakatsukasa H., Mitsui H., Kawaharada Y., Nakamura Y. et al.* Complete genomic structure of the cultivated rice endophyte *Azospirillum* sp. B510 // DNA Res. 2010. Vol. 17, № 1. P. 37–50.
9. *Кушнерук М. А., Тугарова А. В., Ильчукова А. В., Славкина Е. А., Старичкова Н. И., Богатырев В. А., Антонюк Л. П.* Факторы, индуцирующие переход ризобактерий *Azospirillum brasilense* от размножения к покою // Микробиология. 2013. Т. 82, № 5. С. 563–570.
10. *Антонюк Л. П.* Растительные лектины как факторы коммуникации в симбиозах // Молекулярные основы взаимодействия ассоциативных микроорганизмов с растениями / под ред. В. В. Игнатова. М. : Наука, 2005. С. 118–159.
11. *Кряжевских Н. А., Демкина Е. В., Манучарова Н. А., Соина В. С., Гальченко В. Ф., Эль-Регистан Г. И.* Реактивация покоящихся и некультивируемых форм бактерий из древних почв и мерзлых подпочвенных отложений // Микробиология. 2012. Т. 81, № 4. С. 474–485.
12. *Shelud'ko A. V., Makrushin K. V., Tugarova A. V., Krestinenko V. A., Panasenko 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. Vol. 164, № 4. P. 149–156.
13. *Николаев Ю. А., Плакунов В. К.* Биопленка – «город микробов» или аналог многоклеточного организма? // Микробиология. 2007. Т. 76, № 2. С. 149–163.
14. *Петрова Л. П., Шелудько А. В., Кацы Е. И.* Плазмидные перестройки и изменения в формировании биопленок *Azospirillum brasilense* // Микробиология. 2010. Т. 79, № 1. С. 129–132.
15. *Kamnev A. A., Antonyuk L. P., Colina M., Chernyshov A. V., Ignatov V. V.* Investigation of a microbially produced structural modification of magnesium-ammonium orthophosphate // Monatshefte fur Chemie. 1999. Vol. 130, № 12. P. 1431–1442.