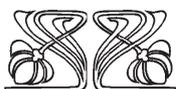
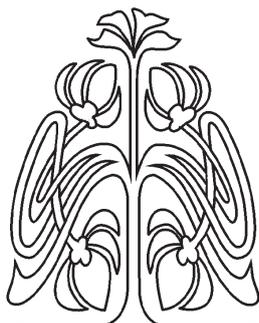
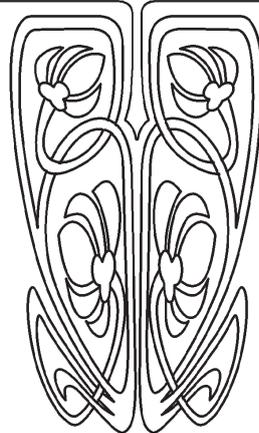




БИОЛОГИЯ



НАУЧНЫЙ
ОТДЕЛ



Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2023. Т. 23, вып. 4. С. 426–436
Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology, 2023, vol. 23, iss. 4, pp. 426–436
<https://ichbe.sgu.ru> <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2023-23-4-426-436>
EDN: JPBABO

Научная статья
УДК 579.26:574.23

Геномные перестройки влияют на устойчивость биопленок почвенных бактерий *Azospirillum brasilense* к абиотическим стрессам

Д. И. Мокеев¹, Е. М. Телешева¹✉, И. В. Волохина¹, С. С. Евстигнеева¹,
Т. Е. Пылаев², Л. П. Петрова¹, Ю. А. Филипьева¹, А. В. Шелудько¹

¹Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Саратовский научный центр Российской академии наук» (ИБФРМ РАН), Россия, 410049, г. Саратов, пр. Энтузиастов, д. 13

²Саратовский государственный медицинский университет имени В. И. Разумовского, Россия, 410012, г. Саратов, ул. Большая Казачья, д. 112

Мокеев Дмитрий Игоревич, младший научный сотрудник лаборатории генетики микроорганизмов, mokeev.d.93@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0558-0775>

Телешева Елизавета Михайловна, младший научный сотрудник лаборатории генетики микроорганизмов, sentebrinka@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9405-1877>

Волохина Ирина Васильевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории генетики микроорганизмов, volokhina_i@ibppm.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9088-481X>

Евстигнеева Стелла Сергеевна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории генетики микроорганизмов, stels20295@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1593-6157>

Пылаев Тимофей Евгеньевич, кандидат биологических наук, директор научно-производственного и образовательного центра молекулярно-генетических и клеточных технологий, pylaevte@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-2701-3333>

Петрова Лилия Петровна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории генетики микроорганизмов, petrova_lp@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1593-6157>

Филипьева Юлия Анатольевна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории генетики микроорганизмов, ljuche@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3182-1007>

Шелудько Андрей Вячеславович, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории генетики микроорганизмов, shel71@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2535-5225>

Аннотация. Используемые в качестве биоудобрений бактерии *Azospirillum brasilense* оказывают существенное положительное влияние на рост и развитие растений. Геном типового штамма *A. brasilense* Sp7 представлен хромосомой и многочисленными плазмидами с молекулярной массой 90, 115 и более 300 МДа. Геномные перестройки, вызывающие



изменения «плазмидного профиля», могут способствовать формированию в бактериальной популяции субпопуляций или фенотипических вариантов. Имеется мало данных о роли таких перестроек в адаптации *A. brasilense* к динамичным условиям окружающей среды. Способность азоспирилл формировать биопленки также имеет определенное значение для успешного функционирования растительно-микробной ассоциации и противостояния бактерий и растений различным абиотическим стрессам.

Цель данной работы заключалась в анализе геномных перестроек у спонтанных производных *A. brasilense* Sp7 и оценке устойчивости их биопленок к высушиванию, водному и окислительному стрессам. ПЦР-анализ для выявления изменений в структуре геномной ДНК проводили с использованием праймеров, соответствующих известным консервативным мотивам в повторяющихся последовательностях нуклеотидов бактерий. Относительное количество биомассы биопленок оценивали, измеряя A_{540} кристаллического фиолетового, десорбированного после ее окрашивания. Уровень относительной респираторной активности клеток в биопленках определяли флуориметрическим резазурин-тестом. Для создания модели осмотического/водного стресса использовали непроницающий осмотический агент ПЭГ 6000. Показано, что перестройки в геномной ДНК способствуют образованию стабильных фенотипических вариантов штамма Sp7, по-разному формирующих биопленки в условиях водного стресса. Отобран производный штамм *A. brasilense* Sp7.8, биопленочная популяция которого устойчивее к водному стрессу по сравнению с таковой у родительского штамма.

Ключевые слова: азоспириллы, плазмиды, геномные перестройки, биопленки, водный и окислительный стрессы

Благодарности: Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 23-26-00271).

Для цитирования: Мокеев Д. И., Телешева Е. М., Волохина И. В., Евстигнеева С. С., Пылаев Т. Е., Петрова Л. П., Филипьева Ю. А., Шелудько А. В. Геномные перестройки влияют на устойчивость биопленок почвенных бактерий *Azospirillum brasilense* к абиотическим стрессам // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2023. Т. 23, вып. 4. С. 426–436. <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2023-23-4-426-436>, EDN: JPBABO

Статья опубликована на условиях лицензии Creative Commons Attribution 4.0 International (CC-BY 4.0)

Article

Genomic rearrangements affect the resistance of biofilms of soil bacteria *Azospirillum brasilense* to abiotic stress

D. I. Mokeev¹, E. M. Telesheva¹ ✉, I. V. Volokhina¹, S. S. Evstigneeva¹,
T. E. Pylaev², L. P. Petrova¹, Yu. A. Filip'echeva¹, A. V. Shelud'ko¹

¹Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms – Subdivision of the Federal State Budgetary Research Institution Saratov Federal Scientific Centre of the Russian Academy of Sciences (IBPPM RAS), 13 Entuziastov Pr., Saratov 410049, Russia

²V. I. Razumovsky Saratov State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 112 Bolshaya Kazachya St., Saratov 410012, Russia

Dmitriy I. Mokeev, mokeev.d.93@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0558-0775>

Elizaveta M. Telesheva, sentebrinka@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9405-1877>

Irina V. Volokhina, volokhina_i@ibppm.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9088-481X>

Stella S. Evstigneeva, stels20295@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1593-6157>

Timofey E. Pylaev, pylaevte@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-2701-3333>

Liliya P. Petrova, petrova_lp@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1593-6157>

Yuliya A. Filip'echeva, ljuche@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3182-1007>

Andrey V. Shelud'ko, shel71@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2535-5225>

Abstract. The bacteria *Azospirillum brasilense*, used as biofertilizers, have a significant positive effect on the growth and development of plants. The genome of the strain *A. brasilense* Sp7 is represented by a chromosome and numerous plasmids with molecular weight of 90, 115, and over 300 MDa. Genomic rearrangements that cause changes in the “plasmid profile” can contribute to the formation of subpopulations or phenotypic variants in a bacterial population. There is little data on the role of such rearrangements in the adaptation of *A. brasilense* to dynamic environmental conditions. The ability of azospirilla to form biofilms also has a determined significance for the successful functioning of the plant-microbial association and the resistance of bacteria and plants to various abiotic stresses. The purpose of this work consisted of the analysis of the genomic rearrangements in spontaneous derivatives of *A. brasilense* Sp7 and the assessment of the resistance of their biofilms to drying, water stress and oxidative stress. PCR analysis to detect changes in the structure of genomic DNA was performed using primers corresponding to known conservative motifs in repetitive bacterial nucleotide sequences. The relative amount of the biofilm biomass was assessed by measuring the crystal violet A540 desorbed after staining. The level of relative respiratory activity of cells in biofilms was determined by the fluorometric resazurin test. The non-penetrating osmotic agent PEG 6000 was used to create the osmotic/water stress model. It was shown that rearrangements in genomic DNA contribute to the formation of stable phenotypic variants of the Sp7 strain, which form biofilms in different ways under water stress conditions. A derived strain of *A. brasilense* Sp7.8, the biofilm population of which is more resistant to water stress compared to the parent strain was selected.

Keywords: azospirilla, plasmids, genomic rearrangements, biofilms, water stress, oxidative stress

Acknowledgements: This research was supported by the Russian Science Foundation (project No. 23-26-00271).

For citation: Mokeev D. I., Telesheva E. M., Volokhina I. V., Evstigneeva S. S., Pylaev T. E., Petrova L. P., Filip'echeva Yu. A., Shelud'ko A. V. Genomic rearrangements affect the resistance of biofilms of soil bacteria *Azospirillum brasilense* to abiotic stress. *Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology*, 2023, vol. 23, iss. 4, pp. 426–436 (in Russian). <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2023-23-4-426-436>, EDN: JPBABO

This is an open access article distributed under the terms of Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC-BY 4.0)



Введение

Используемые в качестве биоудобрений бактерии *Azospirillum brasilense* оказывают существенное положительное влияние на рост растений и их устойчивость к неблагоприятным абиотическим и биотическим факторам [1, 2]. Эксудация растениями легкодоступных источников углерода и специфических сигнальных молекул, абиотические факторы способствуют повышению численности микроорганизмов и их активности в ризосфере, узком слое почвы, прилегающем к растительному корню [3]. Изменение климата, засуха и засоление почв относятся к числу основных абиотических стрессов, с которыми сталкиваются растения и ассоциированные с ними бактерии [4, 5]. В условиях стресса увеличивается потребление растениями ростовых факторов, возникает дефицит ресурсов, приводящий к замедлению роста и развития растений [6]. Подобно растениям ризосферные бактерии также подвергаются стрессу [4]. Ризосферные бактерии для адаптации и повышения конкурентоспособности в занимаемой экологической нише, противостояния абиотическим стрессам используют разнообразные физиолого-биохимические и поведенческие механизмы [1, 3, 7]. Одним из механизмов, посредством которых микроорганизмы адаптируются к изменениям окружающей среды, является фенотипическая изменчивость – явление, которое характеризуется наличием субпопуляции с фенотипом, отличающимся от основной популяции. Такая субпопуляция в соответствующих условиях может стать доминирующей. Фазовые вариации могут затрагивать морфологию колоний, агрегацию клеток и подвижность; синтез капсулы и пигментов; продукцию гликополимеров, различных метаболитов; устойчивость к солевому стрессу и др. [8, 9]. Ранее были описаны спонтанные производные штамма *A. brasilense* Sp7, у которых изменения «плазмидного профиля» коррелируют с их способностью накапливать биомассу в биопленках, сформированных на абиотических поверхностях под жидкой средой, наряду с изменением ряда культурально-морфологических свойств [10–12]. Способность азоспирилл формировать биопленки может иметь определенное значение для успешного формирования и функционирования растительно-микробной ассоциации и противостояния бактерий и растений различным абиотическим стрессам [1, 7, 13]. В биопленках бактерии заключены в матрикс, являющийся резервуаром воды, ферментов и питательных веществ и играющий

структурную и защитную роль [14]. Матрикс биопленок медленно высыхает, чем предохраняет микроорганизмы от изменений водного потенциала. Основные биополимеры матрикса (гликополимеры, белки и нуклеиновые кислоты) биопленок азоспирилл, обеспечивают фиксацию пленок на поверхности и выполняют каркасную функцию, способствуют созданию в биопленках условий для фиксации азота [15–17]. Наличие цистоподобных покоящихся форм в биопленочной популяции повышает устойчивость азоспирилл к таким негативным воздействиям, как высушивание и окислительный стресс [13, 16]. Поскольку «плазмидные перестройки» затрагивают способность формировать биопленки [10–12], можно предположить, что устойчивость биопленок соответствующих производных к стрессу может отличаться от устойчивости пленок исходного штамма *A. brasilense* Sp7. Механизмы, связанные с фенотипической изменчивостью, разнообразны и включают генетические и эпигенетические изменения [18]. Однако наблюдение «плазмидных перестроек» не всегда дает возможность сделать вывод о том, что фенотипические различия между производными Sp7 обусловлены изменениями в составе плазмид [8]. ПЦР-анализ с использованием праймеров, соответствующих известным консервативным мотивам в повторяющихся последовательностях нуклеотидов бактерий, позволяет выявить изменения в структуре геномной ДНК у фенотипических вариантов [8, 19, 20]. Таким образом, основная цель настоящего исследования заключалась в анализе геномных перестроек у спонтанных производных *A. brasilense* Sp7 и оценке устойчивости их биопленок к высушиванию, водному и окислительному стрессам.

Материалы и методы

Штаммы бактерий, питательные среды, определение скорости роста и подвижности бактерий

В работе использовали: штамм *A. brasilense* Sp7, выделенный в Бразилии из ризосферы росички лежачей [21], его производные Sp7.1–Sp7.9 [10–12] и штамм *A. brasilense* Cd, выделенный из корней свинорога пальчатого после инокуляции Sp7 [22]. Бактерии культивировали при 30°C на малатно-солевой среде (МСС) [23] с 1 г/л NH_4Cl . При необходимости в МСС добавляли 2 г/л агара. Для создания условий водного стресса в среды добавляли непроникающий осмотический агент полиэтиленгликоль (ПЭГ) со средней молекулярной массой 6000. ПЭГ 6000 вносили до концентрации 5%, 10% и 15%, что



соответствует -0.05 , -0.15 , -0.30 МПа [4]. Для определения скорости роста жидкие культуры инкубировали при 140 об/мин и температуре 30°C на шейкер-инкубаторе Excella E24 (New Brunswick Scientific). Для изучения подвижности бактерий при микроскопии 24-часовых планктонных культур проводили видеозапись, которую анализировали с помощью компьютерной программы, разработанной в ИБФРМ РАН. Фазово-контрастную и электронную микроскопию выполняли на микроскопах, находящихся в ЦКП «Симбиоз» ИБФРМ РАН (г. Саратов, Россия): Leica DM6000 B (Leica-Microsystems) и Libra 120 (Carl Zeiss).

Анализ формирования биопленок и их характеристика

24-часовые бактериальные культуры из жидкой МСС разводили средой МСС до $A_{590} = 0.05-0.10$ ($l = 0.5$ см). При необходимости в МСС вносили ПЭГ 6000. Среды с инокулятом вносили в ячейки полистирольных планшетов с 96 плоскодонными лунками (по 0.2 мл) или стеклянные пробирки (по 2 мл) и инкубировали при 30°C стационарно. В качестве контроля в ячейки планшетов или пробирки вносили стерильные среды. Для оценки относительного количества биомассы в зрелых биопленках проводили их окрашивание кристаллическим фиолетовым [24]. Связавшийся с биомассой биопленок краситель растворяли 0.2 или 2 мл этанола и измеряли оптическую плотность раствора на фотоколориметре КФК-2 (Загорский оптико-механический завод) или фотометре Multiskan Ascent (ThermoLabsystems). Уровень относительной респираторной активности клеток в биопленках определяли флуориметрическим резазурин-тестом с модификациями. Из лунок планшета с биопленками отбирали планктонную культуру и вносили по 0.2 мл раствора AlamarBlue (Sigma) в 50 мМ фосфатном буфере (ФБ) (рН 7.0) (0.01 г/л). Планшеты инкубировали 24 ч при 30°C . Интенсивность флуоресценции регистрировали на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Agilent) при длине волны возбуждения 530 нм и длине волны эмиссии – 600 нм (ширина щели – 10 нм). Аналогичные манипуляции проводили с контрольными пробами.

Выделение компонентов матрикса проводили согласно рекомендациям, описанным в работе [16]. Биомассу зрелых биопленок, сформированных в стеклянных пробирках, смывали ФБ (рН 7.0). Из отмытой биомассы экстрагировали матрикс 0.5 М ЭДТА [16]. Содержание в экстрактах углеводсодержащих и белковых компонентов определяли фенол-серным методом и реакцией по Бредфорду соответственно [16]. Для определения численности жизнеспособных

форм в биопленках их промывали ФБ (рН 7.0). Количество колониеобразующих единиц (КОЕ) определяли в нативных и сухих биопленках. В последнем случае биопленки сушили при 30°C и 7 дней хранили при 37°C [13]. Для определения КОЕ в пробирки с биопленками вносили по 2 мл ФБ (рН 7.0), инкубировали 1 ч, смывали биомассу и 1 мин диспергировали на встряхивателе Vortex [13]. Из полученной суспензии готовили серию десятикратных разведений и высевали из них по 100 мкл на плотную МСС. Результаты с учетом разведения пересчитывали на 2 мл, что соответствует смыву 1 биопленки. Для определения устойчивости к окислительному стрессу в пробирки с сухими биопленками вносили 2.5 мл раствора H_2O_2 в ФБ (рН 7.0). После 18 ч инкубации удаляли H_2O_2 и вносили 2.5 мл полужидкой среды МСС (0.3% агара) без азота. Через 24–48 ч инкубации фиксировали наличие роста под толщей агара. Отсутствие роста свидетельствует о гибели популяции [13].

Выделение и очистка ДНК, манипуляции с ней

Геномную ДНК выделяли из жидких бактериальных культур с использованием набора GeneJET Genomic DNA Purification Kit (ThermoScientific). Для амплификации ДНК использовали высокоточную ДНК полимеразу iProof High-Fidelity DNA Polymerase (Bio-Rad). ПЦР ставили в термоциклере T100 (BioRad). Продукты ПЦР визуализировали с помощью электрофореза в 2%-ном агарозном геле. В работе были использованы праймеры, соответствующие известным консервативным мотивам в повторяющихся последовательностях нуклеотидов бактерий: 5'-СТАС-GGCAAGGCGACGCTGACG-3' (BOX-ПЦР); 5'-GTTTCCGCC-3' (RAPD-ПЦР); 5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3' и 5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3' (ERIC-ПЦР). Реакции амплификации ставили как описано ранее [8, 19, 20].

Статистическая обработка результатов

Во всех случаях количественных измерений проводили не менее трех независимых экспериментов как минимум в трех повторностях. Оценку биомассы биопленок каждого штамма выполняли не менее шести раз. Результаты обрабатывали с использованием пакета Microsoft Office Excel 2010; доверительные интервалы определяли для 95% уровня значимости.

Результаты и их обсуждение

Анализ скорости роста, морфологии и подвижности бактерий

Сравнение роста штаммов Sp7, Sp7.1–Sp7.9 и Cd в жидких средах показало, что их планктонные культуры не отличались скоростью роста.



Клетки из этих культур несли полярный жгутик, при помощи которого в среднем $86.5 \pm 2.1\%$ бактерий плавали со скоростью $28-30$ мкм/с. В случае производного Sp7.4 длина клеток из 24-часовых планктонных культур (стационарная фаза роста) была больше, чем у Sp7 (соответственно штамму длина клеток составляла 3.6 ± 0.1 и 3.0 ± 0.1 мкм). В случае Sp7.4 увеличение длины клеток может быть следствием перестроек, затронувших участки генома, контролирующие размер клеток.

Размер клеток остальных штаммов и Sp7 не отличался. Полиморфизм размера бактерий типичен для клеток азоспирилл и зависит в том числе от условий культивирования бактерий [21, 22]. Таким образом, культуральные признаки бактерии из жидких планктонных культур штаммов Sp7, Sp7.1–Sp7.3 и Sp7.5–Sp7.9 существенно не различались. На плотной МСС исследованные штаммы формировали колонии с R- или S-фенотипом (табл. 1).

Таблица 1 / Table 1

Характеристика плазмидного состава, морфологии колоний и влияния ПЭГ 6000 на биопленки *A. brasilense*
Characterization of the plasmid composition, colony morphology and the effect of PEG 6000 on *A. brasilense* biofilms

Штам Strain	Плазмиды, МДа Plasmids, MDa	Колонии на плотной МСС Colonies on solid MSM	(а) / (a) A_{540} кристаллического фиолетового, десорбированного после окрашивания биопленок A_{540} of the crystal violet desorbed after biofilm staining				(б) / (b) Респираторная активность, у.е. Respiratory activity, с.у.			
			ПЭГ 6000, % / PEG 6000, %							
			0	5	10	15	0	5	10	15
Sp7	90, 115, >300	R	0.5 ± 0.06 вБ	0.2 ± 0.08 абА	0.3 ± 0.07 бБ	0.1 ± 0.05 аА	85 ± 17 вА	100 ± 11 вБ	32 ± 8 бБ	11 ± 2 аБ
Sp7.1	124, >300	R	0.3 ± 0.08 вА	0.2 ± 0.06 бА	0.2 ± 0.07 абА	0.1 ± 0.06 аА	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
Sp7.2	131, >300	R	0.5 ± 0.06 вБ	0.2 ± 0.08 аб	0.3 ± 0.07 бБ	0.1 ± 0.05 аА	80 ± 14 вА	80 ± 19 вБ	36 ± 7 бБ	12 ± 1 аБ
Sp7.3	121, >300	R	0.5 ± 0.04 бБ	0.2 ± 0.07 аА	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
Sp7.4	131, >300	R	0.5 ± 0.06 вБ	0.3 ± 0.09 бА	0.1 ± 0.06 аА	0.1 ± 0.03 аА	70 ± 12 вА	19 ± 9 бА	6 ± 1 аА	6 ± 1 аА
Sp7.5	94, >300	RS	0.3 ± 0.06 бА	0.2 ± 0.04 аА	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
Sp7.6	90, >300	S	0.3 ± 0.07 аА	0.2 ± 0.05 аА	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
Sp7.7	107, >300	S	0.5 ± 0.05 бБ	0.2 ± 0.07 аА	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
Sp7.8	124, >300	S	0.6 ± 0.10 бБ	1.0 ± 0.15 вБ	0.6 ± 0.16 бБ	0.3 ± 0.09 аб	101 ± 18 бА	100 ± 13 бБ	90 ± 12 бБ	48 ± 10 аб
Sp7.9	94, >300	S	0.5 ± 0.04 бБ	0.3 ± 0.07 аА	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
Cd	90, >300	S	0.4 ± 0.06 бАБ	0.3 ± 0.06 абА	0.2 ± 0.05 аА	0.2 ± 0.05 аб	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.

Примечание. Относительное количество биомассы биопленок (а), сформированных за 7 суток, оценивали, измеряя A_{540} кристаллического фиолетового, десорбированного после ее окрашивания. Респираторную активность биомассы 7-дневных биопленок (б), сформированных без стресса, определяли после их культивирования в течение 10 суток с ПЭГ 6000. Результаты однофакторного дисперсионного (ANOVA) анализа представлены заглавными или строчными буквами; разными буквами обозначены статистически значимые различия между средними. В колонках (а) или (б) результаты сравнения в строке представлены строчными буквами, а в случае сравнения в столбце обозначены заглавными буквами. А или а – средние значения с наименьшей величиной. Н.о. – не определяли.



Исследование формирования биопленок и анализ их устойчивости к водному и окислительному стрессу

Анализ процесса формирования биопленок показал, что все исследованные штаммы на 7-е сутки культивирования завершали процесс формирования биопленок (количество биомассы, образующей пленку, стабилизировалось). Штаммы Sp7.1, Sp7.5 и Sp7.6 формировали менее выраженные пленки, чем родительский штамм (см. табл. 1). У производного Sp7.4 длина клеток в биопленках была больше, чем у штамма Sp7 (соответственно штамму длина составляла 5.0 ± 0.5 и 4.1 ± 0.2 мкм), также как и в случае размера бактерий из планктонных культур.

Для создания модели осмотического/водного стресса использовали непроникающий осмотический агент ПЭГ 6000. Присутствие ПЭГ приводит к снижению водного потенциала среды и блокированию поглощения воды бактериями или корнями растений [4, 25]. Такой подход позволяет обеспечить стабильное снижение уровня водного потенциала в течение любых желаемых периодов времени и моделировать влияние условий засухи на бактериальную популяцию и растения [4, 25]. Концентрации 10–15% ПЭГ блокировали подвижность планктонных клеток всех исследованных штаммов. Под МСС, содержащей 15% ПЭГ, штаммы Sp7, Sp7.1, Sp7.4 и Cd формировали биопленки с минимальным количеством биомассы. В случае Sp7.8 под средой с 5% ПЭГ биопленки этого штамма содержали даже больше биомассы, чем в контроле без стресса. Вариант Sp7.8, формируя биопленки в присутствии ПЭГ (5–15%), накапливал больше биомассы, чем штаммы Sp7, Sp7.1, Sp7.3, Sp7.4 и Cd (см. табл. 1, а).

В другой серии экспериментов на примере Sp7, Sp7.4, Sp7.8 было исследовано влияние ПЭГ на уже сформированные (после 7 суток культивирования) биопленки. Биопленки 10 дней инкубировали со средой, содержащей ПЭГ. Затем измеряли респираторную активность биомассы пленок. В биопленках Sp7 снижение респираторной активности более чем на 70% по сравнению с контролем (без стресса) происходило при

концентрации ПЭГ 15% (см. табл. 1). В случае Sp7.4 значительное снижение уровня респираторной активности происходило в присутствии 5% ПЭГ. Уровень метаболической активности в пленках Sp7.8, сформированных без стресса или в присутствии 10–15% ПЭГ, превосходил аналогичные показатели у родительского штамма или варианта Sp7.4 (см. табл. 1, б).

Частью системы механизмов, способствующих выживанию микробной популяции в условиях засухи/водного стресса, являются бактериальные формы, устойчивые к высушиванию [13, 26]. В нашем исследовании для характеристики таких клеточных форм биопленки (содержали 10^{10} КОЕ) были высушены при 30°C и заложены на хранение при 37°C. Через 10 суток хранения максимальная численность 10^4 КОЕ/биопленка сохранялась в пленках Sp7.8. В аналогичных условиях биопленки Sp7, Sp7.4 и Cd содержали 10^1 КОЕ (табл. 2). Покоящиеся формы Sp7, Sp7.8 и Cd в сухих биопленках сохраняли жизнеспособность после инкубации с 0.01% H_2O_2 , а МИК для них составляла 0.1% H_2O_2 (см. табл. 2). Для покоящихся форм Sp7.4 МИК составляла 0.01% H_2O_2 (см. табл. 2). Покоящиеся формы также являются частью механизмов, способствующих выживанию биопленочной популяции азоспирилл в условиях окислительного стресса, обусловленного H_2O_2 [13]. По сравнению с Sp7, Sp7.8 и Cd покоящиеся формы Sp7.4 оказались более чувствительными к негативному воздействию H_2O_2 , что может являться следствием особенностей адаптации к данному фактору стресса этого штамма. Например, покоящиеся формы, как и биопленки эндофитного штамма *A. baldanioru* Sp245, способного проникать внутрь корней и заселять межклетники проводящей системы, оказались более чувствительными к негативному воздействию H_2O_2 [13, 27]. Ткани корневой системы пшеницы обладают активной системой, регулирующей уровень H_2O_2 [28].

Определенный вклад в устойчивость азоспирилл к водному и окислительному стрессу могут вносить углеводсодержащие составляющие матрикса [5, 13, 17]. Оценка соотношения

Note to table 1. The relative amount of biomass of the biofilms formed over 7 days (a) was estimated by measuring the A_{540} of the crystal violet desorbed after its staining. The respiratory activity of the biomass of 7-day biofilms formed without stress (b) was determined after their cultivation during 10 days with PEG 6000. One-way analysis of variance (ANOVA) results are presented in uppercase or lowercase letters; different letters indicate statistically significant differences between means. In columns (a) or (b), the comparison results in a row are shown in lowercase letters, and in the case of a comparison in a column, they are indicated in capital letters. A or a – average values with the smallest value. N.d. – did not determine.



Таблица 2 / Table 2

Устойчивость к окислительному стрессу (e) покоящихся форм из сухих биопленок (e) *A. brasilense*, сформированных под жидкой МСС

Resistance to oxidative stress (d) of resting forms from dry biofilms (c) *A. brasilense* formed under liquid MSM

Штамм Strain	(a) / (a) <i>A</i> ₅₄₀ кристаллического фиолетового, десорбированного после окрашивания биопленок <i>A</i> ₅₄₀ of the crystal violet desorbed after biofilm staining	*КОЕ из биопленок *CFU from biofilms		(e) / (d) **Наличие бактериального роста под толщиной полужидкой среды после инкубации в растворе H ₂ O ₂ сухих биопленок ** The presence of bacterial growth under the thickness of a semi-liquid medium after incubation of dry biofilms in an H ₂ O ₂ solution		
		(б) / (b) нативные/native	(e) / (c) сухие/dry	H ₂ O ₂ , %		
				0.001	0.01	0.1
Sp7	0.79 ± 0.09	(1.3 ± 0.2) × 10 ¹⁰	(2.5 ± 0.6) × 10 ¹	(+)	(+)	(-)
Sp7.4	0.75 ± 0.10	(1.0 ± 0.2) × 10 ¹⁰	(2.3 ± 0.7) × 10 ¹	(+)	(-)	(-)
Sp7.8	1.05 ± 0.09	(2.4 ± 0.4) × 10 ¹⁰	(1.8 ± 0.3) × 10 ⁴	(+)	(+)	(-)
Cd	0.96 ± 0.09	(2.7 ± 0.3) × 10 ¹⁰	(5.3 ± 0.9) × 10 ¹	(+)	(+)	(-)

Примечание. * – биомассу биопленки смывали 50 мМ ФБ (рН 7.0) объемом 2 мл, в полученной суспензии определяли КОЕ; ** – сухие биопленки после 7 суток хранения инкубировали 48 ч в МСС с 0.3% агара без источника связанного азота, результаты воспроизведены в 3 независимых экспериментах.

Note. * – the biomass of the biofilm was washed off with 2 ml of 50 mM PB (pH 7.0), CFU was determined in the resulting suspension; ** – dry biofilms were incubated for 48 h in MSM with 0.3% agar without a source of bound nitrogen after 7 days of storage, the results are reproduced in 3 independent experiments.

углеводсодержащих и белковых компонентов в матриксе, полученном из смывой с поверхности стекла биомассы биопленок Sp7, Sp7.8 и Cd, показала, что углеводные составляющие доминируют над белковыми (рис. 1). Также необходимо отметить, что из биопленок Sp7.4 экстрагировалось меньше углеводных и белковых составляющих по сравнению с Sp7, Sp7.8 и Cd (см. рис. 1) Бактерии из биопленок Sp7.4 оказались наиболее чувствительными к исследованным стрессам.

Анализ геномных перестроек

С целью выявления изменений в структуре ДНК спонтанных фенотипических вариантов *A. brasilense* были использованы праймеры, соответствующие известным консервативным мотивам в повторяющихся последовательностях нуклеотидов бактерий, для BOX-, ERIC- и RAPD-PCR [8, 19, 20]. Так, в результате BOX-PCR обнаружены различия с родительским штаммом у Sp7.1 и Sp7.4 (см. рис. 1, a); в ERIC-PCR выявлены отличия от Sp7 у Sp7.1, Sp7.3, Sp7.4, Sp7.8 и Sp7.9 (см. рис. 1, б); в RAPD-PCR установлены отличия у Sp7.1, Sp7.2, Sp7.3, Sp7.4, Sp7.7, Sp7.8 и Sp7.9 (см. рис. 1, в). Результаты анализа BOX-, ERIC- и RAPD-PCR свидетельствуют о том, что спонтанные производные отличаются не только от родительского штамма, но и между собой,

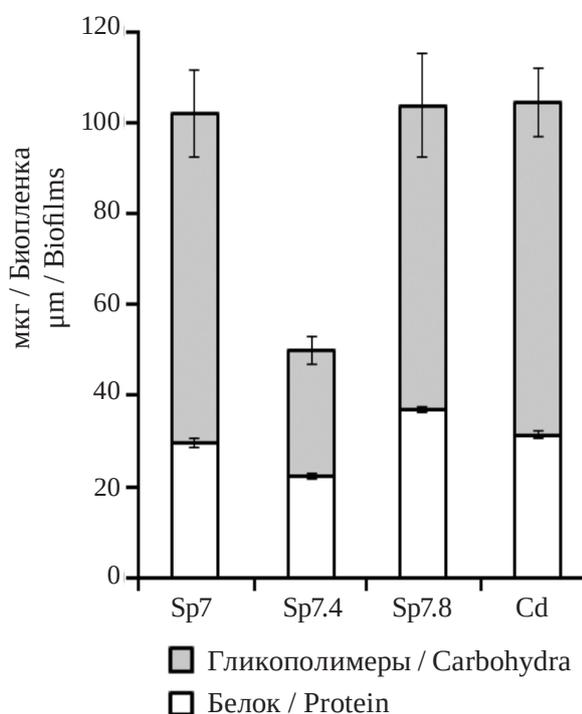


Рис. 1. Содержание гликополимеров и белка в матриксе биопленок *A. brasilense*, сформированных на стекле под жидкой МСС

Fig. 1. Contents of glycopolymers and protein in the matrix of *A. brasilense* biofilms formed on glass under liquid MSM



даже если плазмидные профили у каких-то вариантов похожи (например, Sp7.1 и Sp7.8 или Sp7.2 и Sp7.4 (рис. 2, см. табл. 1). Так, устойчивость к водному стрессу биопленочной популяции производного Sp7.8 выше не только по сравнению с родительским штаммом, но в случае сравнения этого признака с Sp7.1, имеющего сходный «плазмидный профиль» с Sp7.8 (см. рис. 1, табл. 1). Производные Sp7.2 и Sp7.4 имеют похо-

жий плазмидный состав, однако размер клеток Sp7.4 заметно больше бактерий производного Sp7.2, клетки которого не отличаются по длине от Sp7. Таким образом, использование BOX-, ERIC- и RAPD-PCR позволило нам выявить у исследуемых фенотипических вариантов различия в изменениях в структуре геномной ДНК, обуславливающие разницу в фенотипе производных Sp7 со сходным «плазмидным профилем».

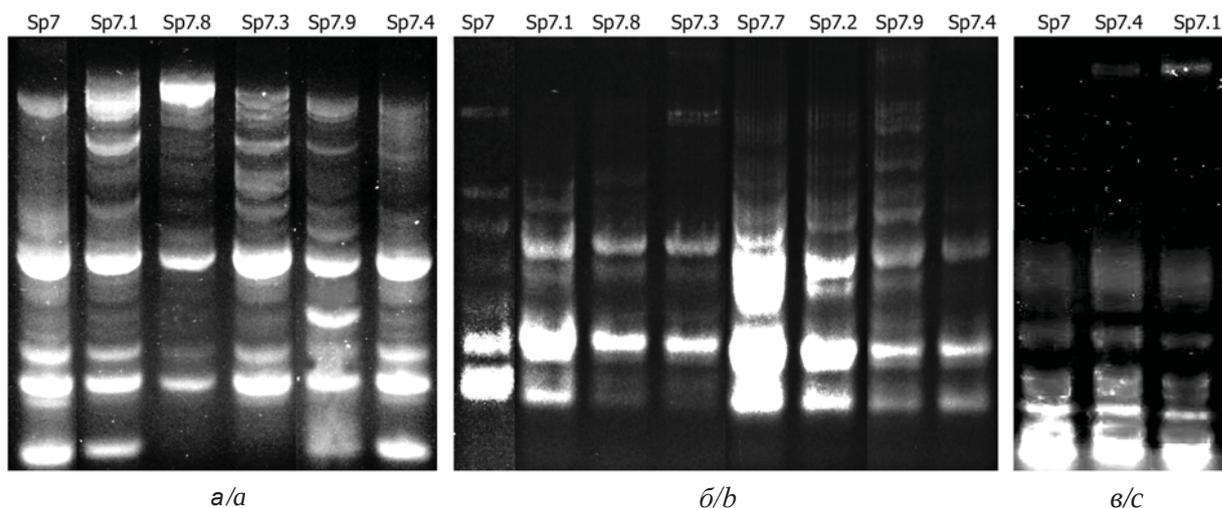


Рис. 2. Результаты электрофореза в 2%-ном агарозном геле продуктов ERIC-ПЦР (а), RAPD-ПЦР (б) и BOX-ПЦР (в) totalной ДНК *A. brasilense*

Fig. 2. The results of electrophoresis in 2% agarose gel of ERIC-PCR (a), RAPD-PCR (b), and BOX-PCR (c) products of *A. brasilense* total DNA

Заключение

Штамм *A. brasilense* Sp7 используют в качестве модели в исследованиях, направленных на подбор ризосферных бактерий, способных повышать устойчивость злаковых культур к негативному влиянию различных видов стресса [8, 13, 29]. В данной работе мы дополнительно изучили генетические, морфологические и физиологические аспекты фенотипической изменчивости у этого штамма. Фенотипические варианты Sp7.1–Sp7.9 оказались стабильными, поскольку после длительного хранения в ходе исследования мы не наблюдали у них реверсию к фенотипу родительского штамма. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что фенотипические варианты штамма Sp7 по-разному формируют биопленки в условиях водного стресса. Варианты Sp7.4 и Sp7.8 интересны для дальнейших исследований, направленных на изучение признаков, которые способствуют выживанию бактерий, стимулирующих рост растений, в неблагоприятных условиях при хранении, инокуляции и колонизации ими расте-

ний и семян, что имеет большое экономическое значение при разработке аграрных технологий с использованием микроорганизмов [1].

Список литературы

1. Fibach-Paldi S., Burdman S., Okon Y. Key physiological properties contributing to rhizosphere adaptation and plant growth promoting abilities of *Azospirillum brasilense* // FEMS Microbiol. Lett. 2012. Vol. 326. P. 99–108. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02407.x>
2. Fukami J., Cerezini P., Hungria M. *Azospirillum*: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation // AMB Expr. 2018. Vol. 8. P. 73–85. <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0608-1>
3. Lipa P., Janczarek M. Phosphorylation systems in symbiotic nitrogen-fixing bacteria and their role in bacterial adaptation to various environmental stresses // PeerJ. 2020. Feb11 : 8 : e8466. <https://doi.org/10.7717/peerj.8466>
4. Ansari F. A., Jabeen M., Ahmad I. *Pseudomonas azotiformans* FAP5, a novel biofilm-forming PGPR strain, alleviates drought stress in wheat plant // Int. J. Environ. Sci. Technol. 2021. Vol. 18. P. 3855–3870. <https://doi.org/10.1007/s13762-020-03045-9>



5. Vurukonda S. S. K. P., Sandhya V., Shrivastava M., Ali S. K. Z. Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria // *Microbiol. Res.* 2016. Vol. 184. P. 13–24. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.12.003>
6. Hsiao T. C. Plant responses to water stress // *Ann. Rev. Plant Physiol.* 1973. Vol. 24. P. 519–570. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.24.060173.002511>
7. Bogino P. C., Oliva M. M., Sorroche F. G., Giordano W. The role of bacterial biofilms and surface components in plant-bacterial associations // *Int. J. Mol. Sci.* 2013. Vol. 14. P. 15838–15859. <https://doi.org/10.3390/ijms140815838>
8. Lerner A., Valverde A., Castro-Sowinski S., Lerner H., Okon Y., Burdman S. Phenotypic variation in *Azospirillum brasilense* exposed to starvation // *Environ. Microbiol. Rep.* 2010. Vol. 2. P. 577–586. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2010.00149.x>
9. Volfson V., Fibach-Paldi Sh., Paulucci N. S., Dardanelli M., Matan O., Burdman S., Okon Y. Phenotypic variation in *Azospirillum brasilense* Sp7 does not influence plant growth promotion effects // *Soil Biology and Biochemistry.* 2013. Vol. 67. P. 255–262. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.09.008>
10. Petrova L. P., Borisov I. V., Katsy E. I. Plasmid rearrangements in *Azospirillum brasilense* // *Microbiology (Moscow).* 2005. Vol. 74, № 4. P. 495–497. <https://doi.org/10.1007/s1102100500948>
11. Petrova L. P., Shelud'ko A. V., Katsy E. I. Plasmid rearrangements and alterations in *Azospirillum brasilense* biofilm formation // *Microbiology (Moscow).* 2010. Vol. 79, № 1. P. 121–124. <https://doi.org/10.1134/S00226261710010169>
12. Katsy E. I., Petrova L. P. Genome rearrangements in *Azospirillum brasilense* Sp7 with the involvement of the plasmid pRhico and the prophage ΦAb-Cd // *Russ. J. Genet.* 2015. Vol. 51, № 132. P. 1165–117. <https://doi.org/10.1134/S1022795415110095>
13. Shelud'ko A. V., Mokeev D. I., Evstigneeva S. S., Filip'echeva Yu. A., Burov A. M., Petrova L. P., Ponomareva E. G., Katsy E. I. Cell ultrastructure in biofilms of *Azospirillum brasilense* // *Microbiology.* 2020. Vol. 89, № 1. P. 50–63. <https://doi.org/10.1134/S0026261720010142>
14. Flemming H.-C., Wingender J. The biofilm matrix // *Nat. Rev. Microbiol.* 2010. Vol. 8, № 9. P. 623–633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>
15. Ramírez-Mata A., López-Lara L. I., Xiqui-Vázquez L., Jijón-Moreno S., Romero-Osorio A., Baca B. E. The cyclic-di-GMP diguanylate cyclase CdgA has a role in biofilm formation and exopolysaccharide production in *Azospirillum brasilense* // *Res. Microbiol.* 2016. Vol. 167. P. 190–201. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2015.12.004>
16. Wang D., Xu A., Elmerich C., Ma L. Z. Biofilm formation enables free-living nitrogen-fixing rhizobacteria to fix nitrogen under aerobic conditions // *ISME J.* 2017. Vol. 11. P. 1602–1613. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.30>
17. Shelud'ko A. V., Filip'echeva Yu. A., Telesheva E. M., Burov A. M., Evstigneeva S. S., Burygin G. L., Petrova L. P. Characterization of carbohydrate-containing components of *Azospirillum brasilense* Sp245 biofilms // *Microbiology.* 2018. Vol. 87, № 5. P. 610–620. <https://doi.org/10.1134/S0026261718050156>
18. Wisniewski-Dyé F., Vial L. Phase and antigenic variation mediated by genome modifications // *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol.* 2008. Vol. 94. P. 493–515. <https://doi.org/10.1007/s10482-008-9267-6>
19. Versalovic J., Koeuth T., Lupski R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes // *Nucleic Acids Res.* 1991. Vol. 19, № 24. P. 6823–6831. <https://doi.org/10.1093/nar/19.24.6823>
20. Fancelli S., Castaldini M., Ceccherini M. T., Di Serio C., Fani R., Gallori E., Marangolo M., Miclaus N., Bazzicalupo M. Use of random amplified polymorphic DNA markers for the detection of *Azospirillum* strains in soil microcosms // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1998. Vol. 49, № 2. P. 221–225. <https://doi.org/10.1007/s002530051162>
21. Tarrand J. J., Krieg N. R., Döbereiner J. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group with description of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum braslense* sp. nov. // *Can. J. Microbiol.* 1978. Vol. 24, № 8. P. 967–980. <https://doi.org/10.1139/m78-160>
22. Eskew D. L., Focht D. D., Ting L. P. Nitrogen fixation, denitrification and pleomorphic growth in a highly pigmented *Spirillum lipoferum* // *Appl. Environ. Microbiol.* 1977. Vol. 34. P. 582–585. <https://doi.org/10.1128/aem.34.5.582-585.1977>
23. Döbereiner J., Day J. M. Associative symbiosis in tropical grass: Characterization of microorganisms and dinitrogen fixing sites // *Symposium on Nitrogen Fixation* / eds. W. E. Newton, C. J. Nijmans. Pullman : Washington State University Press, 1976. P. 518–538.
24. O'Toole G. A., Kolter R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: A genetic analysis // *Mol. Microbiol.* 1998. Vol. 28, № 3. P. 449–461. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00797.x>
25. Chutia J., Borah S. P. Water stress effects on leaf growth and chlorophyll content but not the grain yield in traditional rice (*Oryza sativa* Linn.) genotypes of Assam, India: II. Protein and proline status in seedlings under PEG induced water stress // *Am. J. Plant Sci.* 2012. Vol. 3. P. 971–980. <http://dx.doi.org/10.4236/ajps.2012.37115>
26. Malinich E. A., Bauer C. E. The plant growth promoting bacterium *Azospirillum brasilense* is vertically transmitted in *Phaseolus vulgaris* (common bean) // *Symbiosis.* 2018. Vol. 76, № 2. P. 97–108. <https://doi.org/10.1007/s13199-018-0539-2>
27. Schloter M., Hartmann A. Endophytic and surface colonization of wheat roots (*Triticum aestivum*) by different *Azospirillum brasilense* strains studied with strain-specific monoclonal antibodies // *Symbiosis.* 1998. Vol. 25. P. 159–179.



28. Pradedova E. V., Isheeva O. D., Salyaev R. K. Classification of the antioxidant defense system as the ground for reasonable organization of experimental studies of the oxidative stress in plants // *Russ. J. Plant. Physiol.* 2011. Vol. 58. P. 210–217. <https://doi.org/10.1134/S1021443711020166>
29. Notununu I., Moleleki L., Roopnarain A., Adeleke R. Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on the molecular responses of maize under drought and heat stresses: A review // *Pedosphere.* 2022. Vol. 32. P. 90–106. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(21\)60051-6](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(21)60051-6)
10. Petrova L. P., Borisov I. V., Katsy E. I. Plasmid rearrangements in *Azospirillum brasilense*. *Microbiology (Moscow)*, 2005, vol. 74, no. 4, pp. 495–497. <https://doi.org/10.1007/s1102100500948>
11. Petrova L. P., Shelud'ko A. V., Katsy E. I. Plasmid rearrangements and alterations in *Azospirillum brasilense* biofilm formation. *Microbiology (Moscow)*, 2010, vol. 79, no. 1, pp. 121–124. <https://doi.org/10.1134/S00226261710010169>
12. Katsy E. I., Petrova L. P. Genome rearrangements in *Azospirillum brasilense* Sp7 with the involvement of the plasmid pRhico and the prophage ΦAb-Cd. *Russ. J. Genet.*, 2015, vol. 51, no. 112, pp. 1165–117. <https://doi.org/10.1134/S1022795415110095>
13. Shelud'ko A. V., Mokeev D. I., Evstigneeva S. S., Filip'echeva Yu. A., Burov A. M., Petrova L. P., Ponomareva E. G., Katsy E. I. Cell ultrastructure in biofilms of *Azospirillum brasilense*. *Microbiology*, 2020, vol. 89, no. 1, pp. 50–63. <https://doi.org/10.1134/S0026261720010142>
14. Flemming H.-C., Wingender J. The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2010, vol. 8, no. 9, pp. 623–633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>
15. Ramírez-Mata A., López-Lara L. I., Xiqui-Vázquez L., Jijón-Moreno S., Romero-Osorio A., Baca B. E. The cyclic-di-GMP diguanylate cyclase CdgA has a role in biofilm formation and exopolysaccharide production in *Azospirillum brasilense*. *Res. Microbiol.*, 2016, vol. 167, pp. 190–201. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2015.12.004>
16. Wang D., Xu A., Elmerich C., Ma L. Z. Biofilm formation enables free-living nitrogen-fixing rhizobacteria to fix nitrogen under aerobic conditions. *ISME J.*, 2017, vol. 11, pp. 1602–1613. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.30>
17. Shelud'ko A. V., Filip'echeva Yu. A., Telesheva E. M., Burov A. M., Evstigneeva S. S., Burygin G. L., Petrova L. P. Characterization of carbohydrate-containing components of *Azospirillum brasilense* Sp245 biofilms. *Microbiology*, 2018, vol. 87, no. 5, pp. 610–620. <https://doi.org/10.1134/S0026261718050156>
18. Wisniewski-Dyé F., Vial L. Phase and antigenic variation mediated by genome modifications. *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol.*, 2008, vol. 94, pp. 493–515. <https://doi.org/10.1007/s10482-008-9267-6>
19. Versalovic J., Koeuth T., Lupski R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.*, 1991, vol. 19, no. 24, pp. 6823–6831. <https://doi.org/10.1093/nar/19.24.6823>
20. Fancelli S., Castaldini M., Ceccherini M. T., Di Serio C., Fani R., Gallori E., Marangolo M., Miclaus N., Bazzicalupo M. Use of random amplified polymorphic DNA markers for the detection of *Azospirillum* strains in soil microcosms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1998, vol. 49, no. 2, pp. 221–225. <https://doi.org/10.1007/s002530051162>
21. Tarrand J. J., Krieg N. R., Döbereiner J. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group with description of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two spe-
1. Fibach-Paldi S., Burdman S., Okon Y. Key physiological properties contributing to rhizosphere adaptation and plant growth promoting abilities of *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2012, vol. 326, pp. 99–108. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02407.x>
2. Fukami J., Cerezini P., Hungria M. *Azospirillum*: Benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. *AMB Expr.*, 2018, vol. 8, pp. 73–85. <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0608-1>
3. Lipa P., Janczarek M. Phosphorylation systems in symbiotic nitrogen-fixing bacteria and their role in bacterial adaptation to various environmental stresses. *PeerJ.*, 2020, Feb 11 : 8 : e8466. <https://doi.org/10.7717/peerj.8466>
4. Ansari F. A., Jabeen M., Ahmad I. *Pseudomonas azotoformans* FAP5, a novel biofilm-forming PGPR strain, alleviates drought stress in wheat plant. *Int. J. Environ. Sci. Technol.*, 2021, vol. 18, pp. 3855–3870. <https://doi.org/10.1007/s13762-020-03045-9>
5. Vurukonda S. S. K. P., Sandhya V., Shrivastava M., Ali S. K. Z. Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria. *Microbiol. Res.*, 2016, vol. 184, pp. 13–24. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.12.003>
6. Hsiao T. C. Plant responses to water stress. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 1973, vol. 24, pp. 519–570. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.24.060173.002511>
7. Bogino P. C., Oliva M. M., Sorroche F. G., Giordano W. The role of bacterial biofilms and surface components in plant-bacterial associations. *Int. J. Mol. Sci.*, 2013, vol. 14, pp. 15838–15859. <https://doi.org/10.3390/ijms140815838>
8. Lerner A., Valverde A., Castro-Sowinski S., Lerner H., Okon Y., Burdman S. Phenotypic variation in *Azospirillum brasilense* exposed to starvation. *Environ. Microbiol. Rep.*, 2010, vol. 2, pp. 577–586. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2010.00149.x>
9. Volfson V., Fibach-Paldi Sh., Paulucci N. S., Dardanelli M., Matan O., Burdman S., Okon Y. Phenotypic variation in *Azospirillum brasilense* Sp7 does not influence plant growth promotion effects. *Soil Biology and Biochemistry*, 2013, vol. 67, pp. 255–262. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.09.008>



- cies, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum braslense* sp. nov. *Can. J. Microbiol.*, 1978, vol. 24, no. 8, pp. 967–980. <https://doi.org/10.1139/m78-160>
22. Eskew D. L., Focht D. D., Ting L. P. Nitrogen fixation, denitrification and pleomorphic growth in a highly pigmented *Spirillum lipoferum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1977, vol. 34, pp. 582–585. <https://doi.org/10.1128/aem.34.5.582-585.1977>
23. Döbereiner J., Day J. M. Associative symbiosis in tropical grass: Characterization of microorganisms and dinitrogen fixing sites. In: Newton W. E., Nijmans C. J., eds. *Symposium on Nitrogen Fixation*. Pullman, Washington State University Press, 1976, pp. 518–538.
24. O'Toole G. A., Kolter R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol. Microbiol.*, 1998, vol. 28, no. 3, pp. 449–461. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00797.x>
25. Chutia J., Borah S. P. Water stress effects on leaf growth and chlorophyll content but not the grain yield in traditional rice (*Oryza sativa* Linn.) genotypes of Assam, India: II. Protein and proline status in seedlings under PEG induced water stress. *Am. J. Plant Sci.*, 2012, vol. 3, pp. 971–980. <http://dx.doi.org/10.4236/ajps.2012.37115>
26. Malinich E. A., Bauer C. E. The plant growth promoting bacterium *Azospirillum braslense* is vertically transmitted in *Phaseolus vulgaris* (common bean). *Symbiosis*, 2018, vol. 76, no. 2, pp. 97–108. <https://doi.org/10.1007/s13199-018-0539-2>
27. Schloter M., Hartmann A. Endophytic and surface colonization of wheat roots (*Triticum aestivum*) by different *Azospirillum braslense* strains studied with strain-specific monoclonal antibodies. *Symbiosis*, 1998, vol. 25, pp. 159–179.
28. Pradedova E. V., Isheeva O. D., Salyaev R. K. Classification of the antioxidant defense system as the ground for reasonable organization of experimental studies of the oxidative stress in plants. *Russ. J. Plant. Physiol.*, 2011, vol. 58, pp. 210–217. <https://doi.org/10.1134/S1021443711020166>
29. Notununu I., Moleleki L., Roopnarain A., Adeleke R. Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on the molecular responses of maize under drought and heat stresses: A review. *Pedosphere*, 2022, vol. 32, pp. 90–106. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(21\)60051-6](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(21)60051-6)

Поступила в редакцию 01.06.2023; одобрена после рецензирования 21.06.2023; принята к публикации 01.07.2023
The article was submitted 01.06.2023; approved after reviewing 21.06.2023; accepted for publication 01.07.2023