

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Известия ТСХА, выпуск 2, 2009 год

УДК 579.242; 579.64

РЕГУЛЯЦИЯ РАЗВИТИЯ И ДИССОЦИАТИВНЫХ ПЕРЕХОДОВ СИМБИОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ

А.Ю. ПОГОРЕЛОВА, Н.Г. ЛОЙКО, А.А. ВАНЬКОВА

(Кафедра микробиологии)

В работе исследовали регуляторное влияние внеклеточных метаболитов — растительного лектина (агглютинина зародышей пшеницы (АЗП)) и химического аналога аутоиндукторов анабиоза (C_7 -АОБ) — на рост, образование жизнеспособных (по КОЕ) покоящихся клеток и подвижность в полужидких средах азотфиксирующих бактерий *Azospirillum brasilense* Dobereiner Sp 245. Было обнаружено, что присутствие в среде роста АЗП (1, 5, 10 мкг/мл) не влияло на ростовые характеристики бактерий, но в концентрациях 5 и 10 мкг/мл повышало число жизнеспособных клеток при длительном хранении культуры. При этом наличие лектина в среде роста способствовало как стабилизации исходного морфотипа (Sw^+) по признаку распространения в полужидких средах (10 мкг/мл), так и проявлению полного диссоциативного спектра (5 мкг/мл), включающего вариант, распространяющийся в полужидкой среде в виде агрегатов или микроколоний ($Gr1^+$ фенотип). Присутствие в среде роста азоспирилл C_7 -АОБ (10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} М) уменьшало длительность лаг-фазы, увеличивало максимальную скорость роста и уровень накопления биомассы, а также повышало число жизнеспособных клеток при длительном хранении культуры и стимулировало появление диссоцианта, отличающегося суперроением (Sw^{++} фенотип). Полученные результаты могут быть использованы для получения и селекции фенотипов азоспирилл, различающихся подвижностью в полужидких средах, а также для создания эффективных бактериальных препаратов на основе симбиотрофных бактерий.

Ключевые слова: подвижность, диссоциация, лектин, алкилоксибензолы, *Azospirillum brasilense*.

Микробиота почвы оказывает непосредственное влияние на её плодородие и, как следствие, на урожайность растений. Почвенные микроорганизмы в процессе роста и развития улучшают структуру почвы, накапливают в ней питательные вещества, минерализуют различные органические соединения, превращая их в легко доступные для растения компоненты питания, снабжают растения физиологически активными компонентами (фитогормонами, витаминами и др.) [4]. В связи с этим перспективным направ-

лением в сельском хозяйстве становится применение бактериальных удобрений, обогащающих ризосферу растений полезными микроорганизмами [11]. Использование биопрепаратов не только повышает продуктивность растений, но и позволяет получить более раннюю продукцию, улучшает ее сохранность, снижает норму минеральных азотных удобрений, что положительно сказывается на уровне нитратов и нитритов в продукции [4]. Создание современных бактериальных препаратов сопряжено с селекцией высо-

* Институт микробиологии имени С.Н. Виноградского РАН.

копродуктивных и стрессоустойчивых штаммов, поэтому перспективным объектом для работы в этом направлении становятся азотфиксирующие симбиотрофные ризобактерии рода *Azospirillum*, [6, 7, 10]. Известно, что внесение этих бактерий в почву дает прибавку урожая до 30% [11].

Адаптация симбиотрофных бактерий к окружающим условиям и результативность их симбиоза с высшими растениями во многом зависит от реализации того или иного типа «социального» поведения [1, 12, 13]. Исследования последних лет показали, что для азоспирилл характерны несколько типов «социального» поведения: образование биопленок, распространение в вязких средах с формированием концентрических колец роения (Sw^+ фенотип, от англ. swarming — роение) или коллективная миграция в виде зернистых включений в агар (Gri^+ фенотип, от англ. granular inclusions) или микроколоний [5]. При этом важную роль в проявлении того или иного типа поведения играют метаболиты партнеров симбиоза. Молекулярный механизм формирования азотфиксирующих растительно-бактериальных систем включает функционирование соединений белковой природы — растительных лектинов. Лектины выполняют роль адгезинов, обеспечивая специфическое прикрепление бактериальных клеток к корням растения. Комплексная обработка семян бобовых культур суспензией клубеньковых бактерий и лектином повышает их урожайность на 15-23% по сравнению с обычной инокуляцией, что дает основание рассматривать данный белок как эффектор роста и развития растительного организма в целом [2]. Известно, что микроорганизмы обладают различными типами регуляторных систем, позволяющих им осуществлять межклеточную коммуникацию с помощью низкомолекулярных внеклеточных метаболитов. Одной из групп биологически активных веществ, способных оказы-

вать влияние на адаптацию симбиотрофных бактерий и результативность симбиозов, являются микробные низкомолекулярные внеклеточные метаболиты, имеющие функции аутоиндукторов анабиоза. Эти ауторегуляторы, представленные у ряда бактерий и дрожжей алкилоксибензолами (АОБ), индуцируют переход микробных клеток в гипометаболическое (анабиотическое) состояние и реализуют эту функцию через взаимодействие с широким кругом биополимеров бактериальной клетки [3, 6, 9]. Использование потенциала низкомолекулярных ауторегуляторов при создании бактериальных препаратов может иметь большую перспективу для агrobiотехнологии. В связи с этим явилось целесообразным изучение влияния микробных и растительных низкомолекулярных регуляторов на развитие и реализацию диссоциативных переходов азоспирилл.

Материалы и методы

Объектом исследований были симбиотрофные бактерии *Azospirillum, Azosilense* штамм Sp245 из коллекции Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН (Саратов). Бактерии выращивали на малатной среде [8] (г/л): яблочная кислота — 3,0; дрожжевой экстракт (Kifco) — 0,1; K_2HPK_4 — 3,0; KH_2PK_4 — 2,0; NH_4Cl — 1,5; $MgSk_4-7H_2k$ — 0,2; $MnBk_4-H_2k$ — 0,1; $CaCl_2$ — 0,02; $FeSk_4-7H_2K$ — 0,02; $Na_2Mok_4-2H_2k$ — 0,002; pH 7,0 (доводили до стерилизации 20% NaOH). Растворы $MgSk_4$, $MnSk_4$, $CaCl_2$ и $FeSk_4$ стерилизовали отдельно (1 атм, 30 мин). Культивирование проводили при 28°C в колбах объемом 250 мл (50 мл среды) на качалке (120 об/мин) в течение 48 ч. Инокулят — культуру стационарной фазы роста — вносили в количестве, дающем начальную оптическую плотность (ОП) клеточной суспензии 0,05 ($\lambda=595$ нм, $e=10$ мм, «Specord», Германия). Бактериальные суспензии хра-

нили в течение 5 мес при температуре 20°C.

В качестве растительного ауторегулятора использовали лектин растительного происхождения — агглютинин зародышей пшеницы (АЗП). Водные растворы АЗП вносили в питательные среды так, чтобы конечная концентрация ауторегулятора в среде составляла 1, 5 и 10 мкг/мл.

В качестве микробного ауторегулятора использовали химический аналог фактора анабиоза C_7 -АОБ (метилрезорцин, «Sigma»). В питательные среды C_7 -АОБ вносили в виде этанольных растворов так, чтобы конечная концентрация ауторегулятора составляла 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} М, а этанола 1%. В контрольный вариант вносили эквивалентное количество этанола.

Жизнеспособность азоспирилл определяли путем подсчета числа колониобразующих единиц (КОЕ) при высеве клеточных суспензий на плотную питательную среду (1,5% агара). Посевы инкубировали при 28°C в течение 4–6 сут.

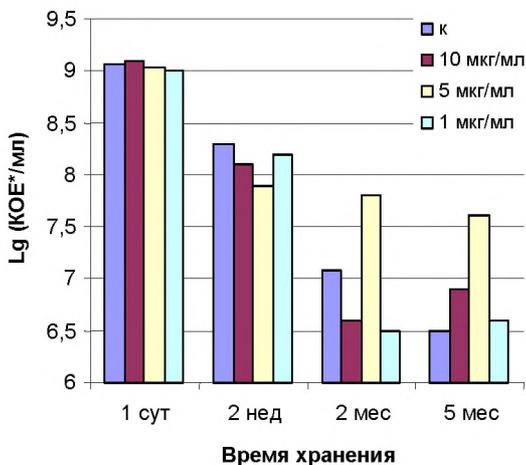
Подвижность бактерий и характер зон их распространения в среде оценивали визуально и измеряли диаметр распространения после инокуляции азоспирилл в малатную среду, содержащую 0,4% агар-агара или фитагеля, и дальнейшей инкубации в течение 4 сут при 28°C.

Повторность измерений в экспериментах трехкратная, при постановке трёх независимых серий опытов. Представленные результаты отражают усредненные величины. Статистический анализ данных проводили с использованием теста Стьюдента, принимая критерий вероятности $P < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

В работе исследовали регуляторное влияние внеклеточных метаболитов — растительного лектина (агглютинина зародышей пшеницы (АЗП)) и химического аналога аутоиндукторов анабиоза (C_7 -АОБ) — на рост, образова-

ние жизнеспособных (по КОЕ) покоящихся клеток и подвижность в полужидких средах азотфиксирующих бактерий *Azospirillum brasilense* Sp 245. Регуляторы вносили в стандартную питательную среду перед инокулированием до конечных концентраций: АЗП — 1, 5 и 10 мкг/мл; C_7 -АОБ — 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} М. Оказалось, что присутствие АЗП не влияло на рост клеток азоспирилл (до стационарной фазы 48 ч), что отслеживали по изменениям ОП клеточных суспензий и величине КОЕ. Однако при длительном хранении полученных бактерий их жизнеспособность в опытных и контрольных вариантах значительно отличалась (рис. 1). Количество жизнеспособных (по КОЕ) покоящихся клеток в вариантах с внесением АЗП в количестве 5 и 10 мкг/мл на протяжении всего срока хранения было выше контрольного, а через 5 мес оказалось в 3 и 11 раз больше соответственно, чем в контроле. В варианте с добавкой АЗП в количестве 1 мкг/мл число клеток, способных образовывать колонии на



* КОЕ — колониобразующие единицы.

Рис. 1. Изменение жизнеспособности клеток *A. brasilense* Sp245, выращенных в присутствии АЗП, при длительном хранении клеточных суспензий (при температуре 20°C)

твердой среде было на 47% меньше, чем в контроле.

Внесение C_7 -АОБ в среду роста способствовало (рис. 2): 1 — уменьшению лаг-фазы во всех исследуемых вариантах; 2 — увеличению максимальной удельной скорости роста в вариантах с концентрацией ауторегулятора 10^{-7} и 10^{-6} М; 3 — увеличению накопления биомассы в вариантах 10^{-6} и 10^{-5} М. Присутствие C_7 -АОБ в концентрации 10^{-7} М уменьшало время пролиферативного цикла и ускоряло переход культуры к стационару, при этом накопление биомассы было меньше, чем в контроле. Добавление C_7 -АОБ в среду роста также увеличивало количество образующихся при длительном хранении жизнеспособных покоя-

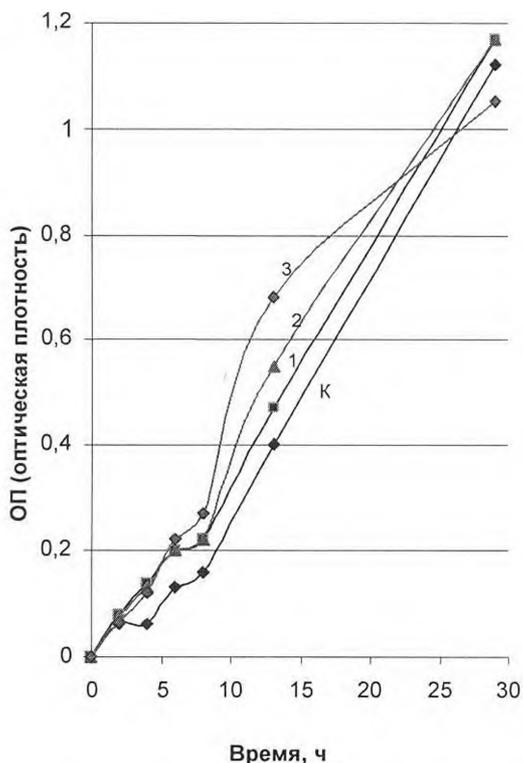
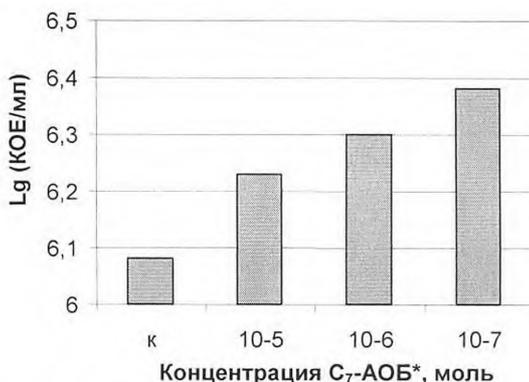


Рис. 2. Рост *A. brasilense* Sp 245 в присутствии C_7 -АОБ в концентрации: 1 — 10^{-5} М, 2 — 10^{-6} М, 3 — 10^{-7} М, К — контроль (без C_7 -АОБ)

щихся форм бактерий (рис. 3). В бактериальных суспензиях с содержанием C_7 -АОБ 10^{-7} , 10^{-6} и 10^{-5} М жизнеспособность клеток через 5 мес хранения была выше контрольной на 5, 3,5 и 2.4% соответственно.



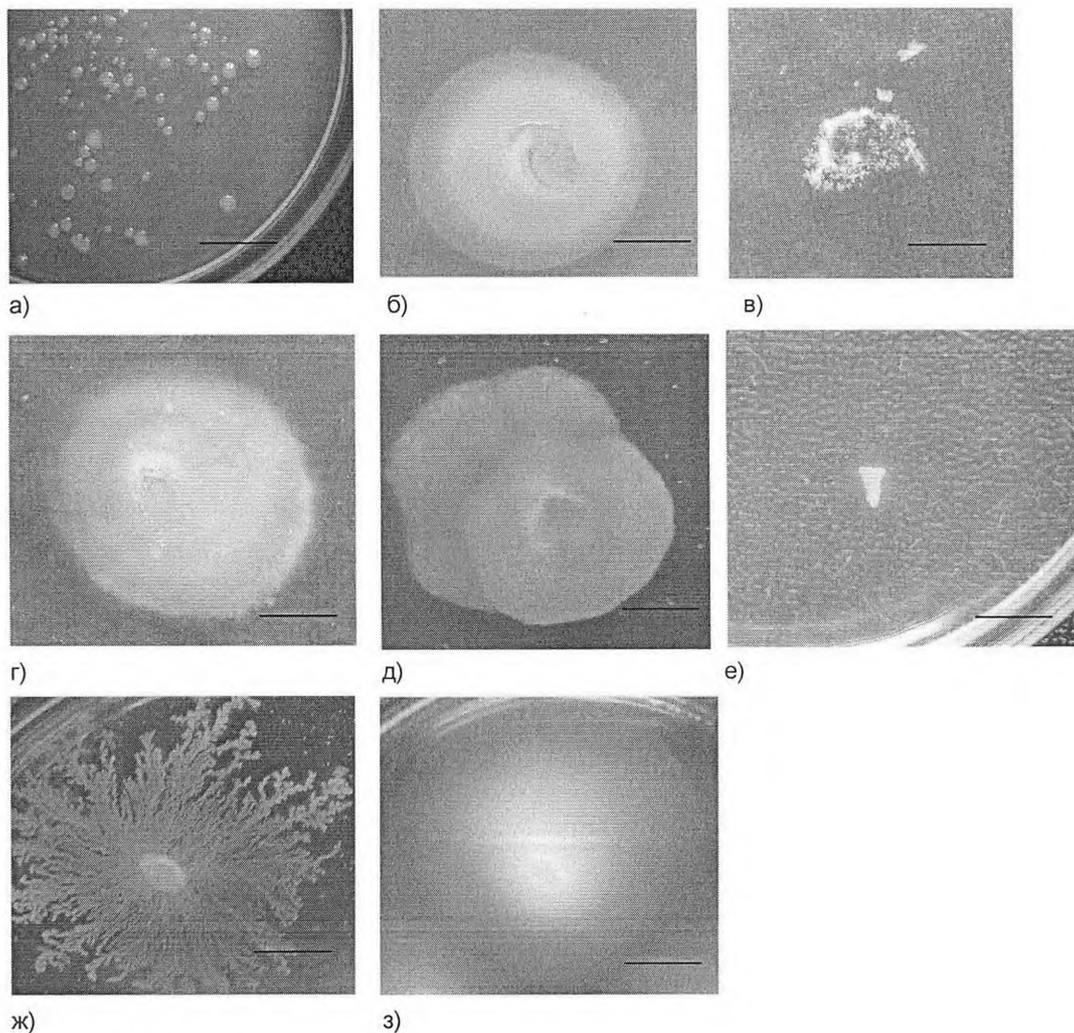
*АОБ — алкилоксибензол.

Рис. 3. Жизнеспособность клеток *A. brasilense* Sp245, выращенных в присутствии C_7 -АОБ и хранящихся в течение 5 мес при температуре 20°C

При расसेве длительно хранящихся (в течение 5 мес) суспензий клеток *A. brasilense* Sp245 на твердую среду было отмечено изменение диссоциативного спектра, выражающееся в нарастании доли мелких колоний во всех исследуемых вариантах (рис. 4 а). (При рассеве двухсуточных клеточных суспензий доминировал исходный фенотип). Одновременно было зафиксировано существенное изменение в подвижности клеток опытных вариантов, которое зависело от концентрации внешних регуляторов и времени хранения клеточных суспензий. Если через неделю хранения суспензий клеток в контроле доминировал Swa^+ фенотип (табл. 1, рис. 4б), определяющий распространение бактерий в виде колец роения, то во всех опытных вариантах с внесением АЗП увеличивалась доля Gri^+ фенотипа — распространение в виде группы клеток, дающих микроколонию (рис. 4 в, г). Данный фенотип отвечает за заселение растущих кор-

Типы подвижности *Azospirillum brasilense* Sp 245
в зависимости от концентрации внесенного АЗП и времени хранения

Время	Контроль	АЗП мкг/мл		
		1	5	10
24 ч	Swa ⁺	Swa ⁺	Swa ⁺ Gri ⁺	Swa ⁺
1 недя	Swa ⁺	Swa ⁺ Gri ⁺	Swa ⁺ Gri ⁺	Swa ⁺ Gri ⁺
2 мес	Swa ⁺	Swa ⁺	Gri ⁺	Swa ⁺ Gri ⁺
5 мес	Swa ⁺	Swa ⁺	Gri ⁺ , Swa ⁻ Gri ⁻	Swa ⁺



* Длина метки, 1 см.

Рис. 4. Диссоцианты бактерий *A. brasilense*: а) диссоциативный спектр после высева на твердую среду клеточной суспензии, хранившейся 5 мес при 20°C; б) Swa⁺ тип; в) Gri⁺ тип; г) Swa⁺Gri⁺ тип; д) протуберанцы; е) Swa⁻Gri⁻; ж) подвижность в фитагеле (1%); з) Swa⁺⁺ тип

ней после «заякоривания» бактерий. В варианте опыта с внесением 5 мкг/мл АЗП также наблюдали появление протуберанцев — зон более быстро движущихся клеток при роении (рис. 4 д). В этом варианте проявлялось наибольшее разнообразие морфотипов после 5-месячного хранения, включая морфотип с отсутствием движения ($Swa^- Gri^-$) (см. табл. 1, рис. 4 е). Это было особенно заметно при инокулировании клетками этого варианта полужидких сред на основе фитагеля, что позволяло максимально моделировать гелеобразную структуру, формирующуюся во-

круг корней растений, за счет продуцирования ими полисахаридов (рис. 4 ж).

В опытах с внесением C_7 -АОБ мы наблюдали появление в пролиферативной фазе фенотипа Swa^{++} , отличающегося суперроением, что коррелировалось с увеличением скорости роста культуры (показанной ранее) в присутствии этого регулятора (рис. 4 з). При хранении клеточных культур фенотип Swa^{++} сохранялся только в варианте с концентрацией C_7 -АОБ 10^{-7} М, в этом же варианте было отмечено и увеличение доли Gri^+ фенотипа (табл. 2, рис. 4 в, г).

Т а б л и ц а 2

Влияние различных концентраций C_7 -АОБ и времени хранения на подвижность *Azospirillum brasilense* Sp 245

Время	Контроль	C_7 -АОБ, М		
		10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}
24 ч	Swa^+	Swa^{++}	Swa^{++}	Swa^{++}
1 нед	Swa^+	$Swa^+ Gri^+$	Swa^+	Swa^+
2 мес	Swa^+	$Swa^+ Gri^+$	Swa^+	Swa^+
5 мес	Swa^+	Swa^{++}	Swa^+	Swa^+

Выводы

1. Присутствие в среде роста симбиотрофных бактерий *A. brasilense* АЗП способствовало увеличению числа жизнеспособных покоящихся клеток при длительном хранении культур.

2. АЗП влияло на диссоциативный спектр выросшей популяции. Варьируя количество АЗП в среде роста, можно добиться как стабилизации исходного морфотипа (10 мкг/мл), так и проявления максимального спектра диссоциантов (5 мкг/мл).

3. Внесение в среду роста симбиотрофных бактерий C_7 -АОБ можно рекомендовать для получения диссоци-

антов с высокими ростовыми характеристиками. Применение данного ауторегулятора будет существенно увеличивать эффективность бактериальных препаратов, используемых для обработки семян перед посевом.

4. Полученные результаты могут быть использованы при разработке условий культивирования симбиотрофных бактерий, составляющих основу бактериальных препаратов. Применение добавок АЗП позволит увеличить количество клеток, способных длительное время сохранять жизнеспособность в почве, а также реализовывать симбиотрофную функцию.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 07-04-01011.

Библиографический список

1. Антонюк Л.П., Евсеева Н.В. Лектин пшеницы как фактор растительно-микробной коммуникации и белок стрессового ответа // Микробиология. 2006. Т.75. №4. С. 544-549.

2 Антонюк Л.П., Игнатов В.В. О роли агглютинина зародышей пшеницы в растительно-бактериальном взаимодействии: гипотеза и экспериментальные данные в ее поддержку // Физиология растений, 2001. Т. 48. №3. С. 427-433.

3. Бухарин О.В., Гинцбург А.Л., Романова Ю.М., Эль-Регистан Г.И. Механизмы выживания бактерий. М.: Медицина, 2005. С. 367.

4 Емцев В.Т., Мишустин Е.Н. Микробиология. М.: Дрофа, 2005.

5. Шелудько А. В., Кацы Е. И. Образование на клетке *Azospirillum brasilense* полярного пучка пилей и поведение бактерий в полужидком агаре // Микробиология, 2001. Т. 70. № 5. С. 1-6.

6. Эль-Регистан Г.И., Мулюкин А.Л., Николаев Ю.А., Сузина Н.Е., Гальченко В.Ф., Дуда В.И. Адаптогенные функции внеклеточных ауторегуляторов микроорганизмов // Микробиология, 2006. Т. 75. № 4. С. 446-456.

7. Baldani V.L.K., Baldani J.I., Kobereiner J. Effects of *Azospirillum* inoculation on root infection and nitrogen incorporation in wheat // Can. J. Microbiol, 1983. V. 29. P. 924-929.

8. Kay J.M., Kobereiner J. Physiological aspects of N-fixation by a Spirillum from Kigitaria roots // Soil Biol. Biochem., 1976. V. 8. P. 45-50.

9. El-Registan G.I., Mulyukin A.L., Nikolaev Yu.A., Stepanenko I.Yu., Kozlova A.N., Martirosova E.I., Shanenko E.F., Strakhovskaya M.G., Revina A.A. The role of microbial low-molecular-weight autoregulatory factors (alkylhydroxybenzenes) in resistance of microorganisms to radiation and heat shock // J. Adv. Space Res, 2005. V. 36. P. 1718-1728.

10. Kwon, Y., and J. Vanderleyden. Root-associated *Azospirillum* species can stimulate plants. ASM News, 1997. 63:366-370.

11. Spaink. H.P, Kondorosi. A., Hooykaas. P.J.J. // The Rhizobiaceae. Molecular Biology of Model plant-Associated Bacteria. 1998. Kordrecht. Boston. London. Kluwer Academic Publishers.

12. Tarrand J.X., Krieg N.E., Kobereiner J. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov // Can. J. Microbiol, 1978. V. 24. P. 967-980.

13. Zhulin I. B., and J. P. Armitage. The role of taxis in the ecology of *Azospirillum*. Symbiosis, 1992. 13:199-206.

Рецензент — к. б. н. АН. Смирнов

SUMMARY

Our work was focused on the regulatory effect of a wheat germ agglutinin (WGA) and chemical analogue of microbial anabiosis inducers (C7-AHB), on the growth of nitrogen-fixing bacteria *Azospirillum brasilense* Sp 245, the formation of their dormant cyst-like cells, and motility in semiliquid medium. The addition of WGA in concentrations of 1, 5 and 10 Kg/ml unaffected the growth of studied bacteria, but favored the better maintenance of viable (plateable) cells in long stored cultures, as compared to the control (without WGA). Also, in the presence of WGA (10 rg/ml), the initial phenotype variant (Swa +) was stable, as judged from motility tests in semiliquid medium. However, in a lesser concentration (5 rg/ml), WGA caused the emergence of a phase variant, capable to propagate in a semiliquid medium in the form of aggregates or microcolonies (Gri +). C7-AHB, being present in the growth medium of azospirilla at 10⁻⁷, 10⁻⁶, and 10⁻⁵ M, shortened the lag-phase, increased the maximum growth rate and the yield of biomass, assisted the preservation of the number of viable cells in old cultures, and stimulated the emergence of super-swarming (Swa ++ variant). The obtained data can be useful for selection of *Azospirillum* Swa ++ phenotypes, differing in motility in semiliquid media, and for creation of efficient bacterial fertilizers on a basis of symbiotrophic bacteria.

Key words: sinorhizobium meliloti, cystic resting cells, alkyloxibenzols, autoinductors of anabiosis, adiaiphoria, mobility.