

АНАТОМИЯ И ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

УДК 339.13.012

ИЗУЧЕНИЕ СОСТОЯНИЯ ПОКОЯ У *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* – БАКТЕРИЙ-СИМБИОНТОВ ТРАВЯНИСТЫХ РАСТЕНИЙ

Л. П. Антонюк¹, Н. И. Старичкова², Е. А. Славкина¹,
М. А. Ханадеева¹

¹ Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов
Российской Академии наук
Россия, 410049, Саратов, пр. Энтузиастов, 13
E-mail: antonyuk_l@ibppm.ru

² Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского
Россия, 410010, Саратов, ул. Астраханская, 83
E-mail: natstar-12@mail.ru

Поступила в редакцию: 15.06.2016 г.

Изучение состояния покоя у *Azospirillum brasilense* – бактерий-симбионтов травянистых растений. – Антонюк Л. П., Старичкова Н. И., Славкина Е. А., Ханадеева М. А. – Проведена оценка жизнеспособности бактериальных клеток в покоящихся (длительно-хранящихся) культурах *Azospirillum brasilense* и изучено возобновление их размножения в присутствии белка АЗП – компонента корневых выделений растения-хозяина. Установлено, что культура *A. brasilense* в течение 3.5 лет сохраняет число жизнеспособных клеток, достаточное для возобновления роста бактерий в свежей среде. Азоспириллы также не утрачивали жизнеспособности при персистенции в стрессовых условиях. Белок АЗП (агглютинин зародышей пшеницы) стимулировал реактивацию роста *A. brasilense* Sp245, поддерживаемой в условиях стресса в течение 1 года.

Ключевые слова: симбиоз у высших растений, *Azospirillum brasilense*, состояние покоя, корневые выделения, агглютинин зародышей пшеницы (АЗП).

Study of a dormant state in *Azospirillum brasilense*, symbiotic bacteria herbaceous plants – Antonyuk L. P., Starichkova N. I., Slavkina E. A., Khanadeeva M. A. – The evaluation of the viability of the bacterial cells in dormant

(long-stored) cultures *Azospirillum brasilense* and the renewal of their reproduction in the presence of the protein WGA, a component of root exudates of the host plant, were studied. It was found that for 3.5 years the number of viable *A. brasilense* cells the culture retained sufficient to resume growth in fresh medium. Azospirilla also not lose viability when persisted under stress conditions. Protein WGA (wheat germ agglutinin) stimulated the reactivation of growth *A. brasilense* Sp245, supported under stress for 1 year.

Keywords: symbiosis in higher plants, *Azospirillum brasilense*, dormant state, root exudates, wheat germ agglutinin (WGA).

Бактерии рода *Azospirillum* – естественные обитатели корневой системы многих травянистых растений, обладающие способностью к стимуляции роста и развития растения-хозяина (Bashan et al., 2004; Pii et al., 2015). На основании этой выраженной их способности большинство представителей рода относят к функциональной группе рост-стимулирующих ризобактерий (PGPR – plant growth promoting rhizobacteria). Азоспириллы имеют две фазы жизненного цикла: фазу активной жизнедеятельности, сопряженную с вегетацией растения-хозяина, и фазу покоя. Считается, что период зимнего покоя эти бактерии-симбионты переживают на семени (Волкогон и соавт., 1995). Учитывая то, что колонизация корней микробами происходит в первые дни после прорастания семян и в условиях жесткой конкуренции, очевидно, что преимущество имеют те бактерии, которые быстро выходят из состояния покоя.

Экспериментальные данные по физиологии, биохимии и генетике *A. brasilense* получены почти исключительно в экспериментах с вегетативными, т.е. размножающимися клетками (Игнатов, 2005; Bashan et al., 2004; Pii et al., 2015). Что касается покоящихся форм этих бактерий, то публикации по ним пока единичны и связаны с изучением в лабораторных условиях непролиферирующих (не размножающихся) культур *Azospirillum brasilense* (Муллюкин и соавт., 2009; Ильчукова и соавт., 2010). Такие культуры называют также персистирующими или длительно-хранящимися. Известно, что азоспириллы при длительном хранении образуют цисты, которые сохраняют высокий ростовой потенциал и в благоприятных условиях быстро переходят к размножению (Муллюкин и соавт., 2009).

Накоплены сведения, позволяющие предположить, что симбиозы высших растений с азоспириллами и другими PGPR формируются в основном с участием покоящихся бактерий семени, а не почвы (Волко-

ИЗУЧЕНИЕ СОСТОЯНИЯ ПОКОЯ У *AZOSPIRILLUM BRASILENSE*

гон с соавт., 1995; Vacilio-Jimenez et al., 2001; Антонюк, 2007). Актуальность изучения непролиферирующих состояний у азоспирилл и разработка протокола получения покоящихся форм связана также с необходимостью проверки предположения, касающегося одной из функций лектина пшеницы (агглютинина зародышей пшеницы, АЗП), входящего в состав корневых выделений. Предполагается, что этот лектин является не только фактором роста для *A. brasilense*, но и фактором оживления покоящихся форм азоспириллы (Игнатов, 2005).

В связи с вышесказанным была проведена работа по оценке жизнеспособности длительнохранящихся (персистирующих) культур *A. brasilense* и изучение реактивации их роста в присутствии АЗП.

Материал и методы

Эксперименты были проведены с *A. brasilense* Sp245 – природным симбионтом пшеницы. Штамм был получен из коллекции Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН (ИБФРМ РАН г. Саратов). Бактерии выращивали при температуре 31°C в жидких культурах на малатной синтетической среде (МС) и на среде Доберейнер модифицированной (ДМ).

Среда МС имела следующий состав (г/л): Na_2HPO_4 – 3.6; NaH_2PO_4 – 2.4; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.2; $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ – 0.02; NaCl – 0.1; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 0.002; дрожжевой экстракт – 0.1; NH_4Cl – 0.5; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,02; яблочная кислота – 3.76; NaOH – 2.24 (указанные количества яблочной кислоты и NaOH соответствуют 5 г малата Na). Значение pH доводили до 6.8 перед автоклавированием, используя 10 М NaOH . Среду МС автоклавировали в течение 30 минут при 1 атм. Соли $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ и CaCl_2 были приготовлены в виде стоковых, 500-кратных стерильных растворов, которые добавлялись в среду культивирования после ее автоклавирования из расчета 200 мкл на 100 мл среды. Железо в среду вносили в хелатной форме из расчета 10 мл раствора на литр среды перед автоклавированием. Раствор хелатного железа содержал, г/л: $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 2.0; нитрилтриуксусная кислота – 5.6. Смесь FeSO_4 и кислоты растворяли в небольшом количестве дистиллированной воды, добавляли по каплям 1N NaOH до полного растворения компонентов и появления характерной темно-янтарной окраски.

Л. П. Антонюк, Н. И. Старичкова, Е. А. Славкина и др.

Среда ДМ имела следующий состав (г/л): K_2HPO_4 – 0.1; KH_2PO_4 – 0.4; NaCl – 0.1; $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0.2; $CaCl_2 \times 2H_2O$ – 0.2; $Na_2MoO_4 \times 2H_2O$ – 0.002; глюкоза – 2.5; триптофан – 0.14; $FeSO_4 \times 7H_2O$ – 10 мл/л. Значение pH доводили до 6.8 перед автоклавированием, используя 10 М NaOH. Режим стерилизации среды, способ внесения солей $MgSO_4 \times 7H_2O$, $CaCl_2$, $MnSO_4 \times 5H_2O$ и $FeSO_4 \times 7H_2O$ были такими же, как в случае малатной синтетической среды.

При выращивании *A. brasilense* Sp245 на чашках Петри использовали среду МС, в которую перед автоклавированием добавляли агар до конечной концентрации 2%.

При работе с вегетативными культурами штамма Sp245, прекультуру выращивали при 31 – 32°C в аэробных условиях на качалке (180 об/мин) в колбах Эрленмейера в течение 24 ч на среде МС. При работе с персистирующими культурами, их пересеивали непосредственно в жидкие культуры (на среду МС или ДМ) или на чашки Петри. Экспериментальные культуры засеивали с таким расчетом, чтобы в стартовой точке роста плотность бактерий составляла 10^2 или 10^3 клеток на миллилитр. Контроль чистоты культуры во всех экспериментах осуществлялся методом раздавленной капли с использованием микроскопа «Olympus» (модель C011, Япония) при увеличении в 400 раз.

Анализ числа жизнеспособных клеток (колониеобразующих единиц, КОЕ) проводили по общепринятой методике: после окончания культивирования стерильно готовили последовательные десятикратные разведения суспензий бактерий в физрастворе (0.85% NaCl), которые высевали на чашки с плотной агаризованной средой МС, и после двухсуточной инкубации при 31°C проводили подсчет числа образовавшихся колоний.

Для оценки оптических параметров роста культур измеряли оптическую плотность бактериальных культур при длине волны 595 нм на спектрофотометре Specol 221 (Carl Zeiss, Германия).

В работе использовали две персистирующие культуры *A. brasilense* Sp245, одна из которых перед закладкой на хранение была выращена в оптимальных условиях, другая – в стрессовых. Первую, нестрессированную культуру культивировали в темных 1-литровых бутылках на среде МС, из которой был исключен NH_4Cl для индукции у азоспириллы азотификации. *A. brasilense* Sp245 культивировали без использования качалки, сначала 1 месяц при 31°, а затем – при комнатной температуре.

ИЗУЧЕНИЕ СОСТОЯНИЯ ПОКОЯ У *AZOSPIRILLUM BRASILENSE*

Для второй, стрессированной, культуры среда МС была модифицирована для создания стресса по 3 следующим параметрам: содержание фосфатов было снижено 5-кратно (K_2HPO_4 – с 3 до 0.6 г/л; KH_2PO_4 – с 2 до 0.4 г/л); содержание дрожжевого экстракта также было снижено 5-кратно (с 0.1 до 0.02 г/л); NH_4Cl был исключен из среды; температура культивирования была снижена и составляла вначале +10°C, затем была снижена до – 1°C. После инкубации бактерий в таких условиях стрессированные культуры была разделена на два варианта по температурному режиму – С1 и С2; в каждом из них тестировали число жизнеспособных клеток.

Все эксперименты проводились в трехкратной повторности, статистическую обработку полученных данных проводили с использованием статистического пакета анализа данных программы Microsoft Office Excel 2003.

Результаты и их обсуждение

В связи с тем что многие бактерии при длительном хранении в лабораторных условиях теряют жизнеспособность и не образуют колоний при пересеве на твердые среды, в задачу исследования входила оценка жизнеспособности бактерий в персистирующих культурах *A. brasilense* при очень длительных сроках хранения и пересева – более трех лет. Кроме того, важно было выяснить, насколько долго азоспириллы сохраняет жизнеспособность в условиях жесткого стресса. Полученные результаты представлены в табл. 1 и 2.

Таблица 1

Анализ числа жизнеспособных клеток в длительно хранящейся культуре *Azospirillum brasilense* Sp245, выращенной в оптимальных условиях

Культура, возраст	Число жизнеспособных клеток, КОЕ/мл
Вегетативная*, 18-часовая	$(7.85 \pm 0.082) \times 10^8$
Персистирующая*, 2 года 2 мес.	$(2.13 \pm 0.07) \times 10^4$
Персистирующая, 3.5 года	$(1.45 \pm 0.28) \times 10^3$

Примечание: В вариантах, отмеченных *, приведены данные, полученные для данной культуры ранее (Ильчукова и соавт., 2010).

На первом этапе исследования культура штамма Sp245 выращивалась в оптимальных условиях и хранилась при комнатной (т.е. не-стрессовой для азоспириллы) температуре.

Как видно из данных в табл. 1, после 26 месяцев персистенции выживает примерно 1 из 10000 клеток – КОЕ снижается с $\sim 8 \times 10^8$ до $\sim 2 \times 10^4$ кл./мл. Проведенный подсчет показал, что с течением времени происходит дальнейшее падение жизнеспособности, и к достижению возраста 3,5 года число жизнеспособных клеток составляет $\sim 1,5 \times 10^3$ кл./мл, т. е. жизнеспособность сохраняет каждая сотысячная клетка азоспириллы.

Таблица 2
Оптическая плотность *Azospirillum brasilense* Sp245 на среде ДМ

Время культивирования, час	Стартовая плотность бактериальной культуры	
	10^2 кл./мл	10^3 кл./мл
0–67	0	0
116	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01
142	0.04 ± 0.01	0.05 ± 0.01
163	0.05 ± 0.02	0.07 ± 0.02
186	0.05 ± 0.02	0.08 ± 0.03
260	0.11 ± 0.02	0.11 ± 0.04
290	0.38 ± 0.11	0.36 ± 0.10
427	0.71 ± 0.28	0.74 ± 0.12

На среде ДМ азоспириллы росла значительно хуже, анализ жизнеспособности проводили по изменению оптической плотности культуры в первые 500 ч роста (см. табл. 2). Оптическую плотность культур измеряли в течение 61 дня. В первые несколько суток (до 67 ч, см. табл. 2) рост азоспириллы не фиксировался, затем оптическую плотность уже можно было зарегистрировать, однако она была очень низкой (до 260 ч). Экспоненциальный рост культуры начинался примерно с 290 ч (~ 12 суток). Как видно из данных табл. 2, снижение стартовой плотности с 10^3 до 10^2 кл./мл не оказывало существенного влияния на рост культуры.

Таким образом, в целом *A. brasilense* Sp245, выращенная и хранящаяся вне стресса, хорошо переживает пролонгированное хранение и сохраняет жизнеспособность, достаточную для восстановления роста популяции при наступлении благоприятных условий.

Оптимальные условия роста лабораторных культур не всегда моделируют природные условия, т.к. в природе бактерии повсеместно подвержены стрессу. Как правило, в стрессовом диапазоне значений

ИЗУЧЕНИЕ СОСТОЯНИЯ ПОКОЯ У *AZOSPIRILLUM BRASILENSE*

бывает не один фактор, а несколько. Наиболее частыми стрессами являются нехватка тех или иных питательных веществ, неоптимальная температура, неблагоприятные значения pH, наличие токсических веществ. В наших экспериментах для создания комплексного стресса была использована модифицированная среда МС и два варианта температурного режима.

Азоспириллам создавали трофический и температурный стресс (см. «Материал и методы»). Затем дополнительно, чтобы проверить, приводит ли к улучшению жизнеспособности азоспириллы изменение температурного фактора от неблагоприятного (-1°C) к благоприятному ($+20 - +25^{\circ}\text{C}$), одну из колб перенесли из холодильника в лабораторное помещение и рассматривали ее как культуру с комбинированным температурным режимом (С1). Вторая культура оставалась все время наблюдения в холодильнике при $+10^{\circ}\text{C}$, и ее рассматривали как культуру с холодовым температурным режимом (С2). Полученные результаты приведены в табл. 3.

Таблица 3

Жизнеспособность *A. brasilense* Sp245 в 1-годичных культурах, поддерживаемых в стрессовых условиях

Культура	Число жизнеспособных клеток, КОЕ/мл
1-годичная, с холодовым температурным режимом	$(3.6 \pm 0.74) \times 10^8$
1-годичная, с комбинированным температурным режимом	$(2.3 \pm 0.35) \times 10^8$

Как видно из данных, приведенных в табл. 3, стрессированные культуры имели исключительно высокий титр жизнеспособных клеток – от 2.3×10^8 до 3.6×10^8 клеток в 1 мл культуры.

Далее 1-годичную культуру *A. brasilense* Sp245 с комбинированным температурным режимом (С1) пересевали на среду ДМ с тем, чтобы оценить реактивацию роста азоспириллы в присутствии и отсутствии АЗП. Для этого в 20 мл среды вносили 2 мл 1-годичной культуры. В ходе эксперимента выращивали контрольную культуру, в которую АЗП не добавляли и три варианта опытной культуры, в которые добавляли АЗП в следующих концентрациях – 1 нг/мл, 1 мкг/мл и 0.1 мкг/мл. Результаты оценки жизнеспособности бактерий в семи-дневных культурах азоспириллы представлены в табл. 4.

Как видно из представленных данных, контрольная культура за одну неделю достигает плотности 5×10^6 клеток в 1 миллилитре. АЗП, внесенный в среду роста вместе с инокулятом, во всех случаях вызывал увеличение числа жизнеспособных клеток в культуре. Эффект лектина пшеницы был наиболее выраженным при концентрации АЗП 1 нг/мл: число КОЕ в этом случае увеличилось с 5×10^6 до $0.9 \times 10^8 - 3.4 \times 10^8$, т.е. в 18–68 раз.

Таблица 4

Реактивация роста 1-годичной стрессированной культуры *A. brasilense*

Концентрация АЗП в среде	Высев из 5-го разведения	Высев из 6-го разведения
Культура до посева на свежую среду	$(3.4 \pm 0.45) \times 10^7$	$(1.7 \pm 0.04) \times 10^8$
Культура без АЗП	$(5.0 \pm 0.13) \times 10^6$	$(5.3 \pm 0.6) \times 10^6$
1 мкг/мл	$(6.2 \pm 0.36) \times 10^7$	$(4.1 \pm 0.61) \times 10^8$
0.1 мкг/мл	$(3.3 \pm 0.53) \times 10^7$	$(1.5 \pm 0.16) \times 10^8$
1 нг/мл	$(9.0 \pm 0.58) \times 10^7$	$(3.4 \pm 0.81) \times 10^8$

Таким образом, полученные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что лектин АЗП способен ускорять «оживление» непролиферирующих азоспирилл. Представленные в работе результаты позволяют сделать следующие выводы.

1. Ризобактерия *A. brasilense* Sp245 отличается хорошей персистенцией: в течение 3,5 лет культура азоспириллы сохраняет число жизнеспособных клеток, достаточное для возобновления роста при наступлении благоприятных условий.

2. *A. brasilense* Sp245 не теряет жизнеспособности при комплексном стрессе, включая жесткий низкотемпературный стресс, сохраняя высокий уровень жизнеспособных клеток в течение года.

3. АЗП в концентрационном диапазоне 1 нг/мл – 1 мкг/мл стимулирует реактивацию роста 1-годичной стрессированной культуры *A. brasilense*.

К настоящему времени охарактеризовано значительное число представителей *A. brasilense* и *A. lipoferum*, колонизирующих корни высших растений (Игнатов, 2005; Bashan et al., 2004). Учитывая сходство в строении и физиологии различных штаммов азоспирилл, можно предположить, что выявленные нами закономерности характерны не

ИЗУЧЕНИЕ СОСТОЯНИЯ ПОКОЯ У *AZOSPIRILLUM BRASILENSE*

только для *A. brasilense* Sp245, но и для других азоспирилл, обитающих в корневой системе и семенах травянистых растений.

Список литературы

Антонюк Л. П. Микрофлора семян – источник ризобактерий при формировании симбиозов у пищевых и кормовых растений // Вавиловские чтения – 2007: материалы междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 120-й годовщине со дня рождения акад. Н. И. Вавилова. Саратов: ИЦ «Научная книга», 2007. Ч. 3. С.10 – 12.

Волкогон В. В., Мамчур А. Е., Лемешко С. В., Миняйло В. Г. Азоспириллы – эндофиты семян злаковых растений // Микробиол. журн. 1995. Т. 57, № 1. С. 14 – 19.

Игнатов В. В (ред.). Молекулярные основы взаимоотношений ассоциативных микроорганизмов с растениями. М.: Наука, 2005. 262 с.

Ильчукова А. В., Тугарова А. В., Антонюк Л. П. Изучение покоя у ризобактерий *Azospirillum brasilense* при длительном культивировании // Вестн. Саратов. агроун-та. 2010. № 2. С. 7 – 9.

Мулюкин А. Л., Сузина Н. Е., Погорелова А. Ю. и др. Разнообразие морфотипов покоящихся клеток и условия их образования у *Azospirillum brasilense* // Микробиология. 2009. Т. 78, № 1. С. 42 – 51.

Bacilio-Jimenez M., Aguilar-Flores S., del Valle M. V. et al. Endophytic bacteria in rice seeds inhibit early colonization of roots by *Azospirillum brasilense* // Soil Biol. Biochem. 2001. Vol. 33, № 2. P. 167 – 172.

Bashan Y., Holguin G., de-Bashan L. E. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997–2003) // Can. J. Microbiol. 2004. Vol. 50, № 8. P. 521 – 577.

Pii Y., Mimmo T., Tomasi N., Terzano R. et al. Microbial interactions in the rhizosphere: beneficial influences of plant growth-promoting rhizobacteria on nutrient acquisition process // Biol. Fertil. Soils. 2015, Vol. 51, № 4. P. 403 – 415.