

УДК 57.574/577

## ОСОБЕННОСТИ ПОЛУЧЕНИЯ ПОКОЯЩИХСЯ КУЛЬТУР БАКТЕРИЙ РОДА AZOSPIRILLUM

<sup>1</sup>Милова О.А., <sup>1</sup>Славкина Е.А., <sup>1</sup>Плешакова Е.В., <sup>2</sup>Антонюк Л.П.

<sup>1</sup>Саратовский национальный исследовательский государственный университет  
имени Н.Г. Чернышевского, Саратов,

e-mail: milova.ox@yandex.ru, lizka-08@yandex.ru, plekat@yandex.ru;

<sup>2</sup>Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук,  
Саратов, e-mail: antonyuk\_l@ibppm.ru

В ходе выполнения работы были проведены эксперименты, позволившие получить покоящиеся культуры *A. brasilense* SR80, *A. doebereinae* GSF71, *A. thiophilum* VSU BV-S, *A. fermentarium* CC-LY743 и *A. melinis* TMCY 0552, а также изучить некоторые свойства dormantных форм. Бактерии в данном физиологическом состоянии характеризовались некультивируемостью – потерей способности размножаться на твердой среде, но сохраняли пролиферативный потенциал. По итогам работы для бактерий рода *Azospirillum* предложен протокол получения их покоящихся форм, что открывает возможности изучения как физиологического состояния покоя у азоспирилл, так и особенностей быстрого перехода dormantных бактерий к делению. Основой протокола является перенесение вегетативных клеток азоспирилл в физиологический раствор (0,9% NaCl), содержащий 4-н-гексилрезорцин и CuSO<sub>4</sub>. При глубоком стрессе, которому подвергались азоспириллы в ходе получения их покоящихся форм, бактерии демонстрировали социальное поведение. В результате использования современной микроскопии в изучаемых культурах были обнаружены флоккулы и кристаллы. При изучении флоккул было установлено, что они содержат не только клетки, но и матрикс и фактически представляют собой одну из разновидностей биопленки.

**Ключевые слова:** стресс, покоящаяся культура, азоспириллы, флоккулы, кристаллы

## PERCULIARITIES OF OBTAINING RESTING BACTERIAL CULTURES OF THE GENUS AZOSPIRILLUM

<sup>1</sup>Milova O.A., <sup>1</sup>Slavkina E.A., <sup>1</sup>Pleshakova E.V., <sup>2</sup>Antonyuk L.P.

<sup>1</sup>Saratov State University named N.G. Chernyshevsky, Saratov,

e-mail: milova.ox@yandex.ru, lizka-08@yandex.ru, plekat@yandex.ru;

<sup>2</sup>The Russian Academy of Sciences' Institute of Biochemistry and Physiology of Plants  
and Microorganisms, Saratov, e-mail: antonyuk\_l@ibppm.ru

In the course of this work, experiments were carried out which made it possible to obtain resting cultures of *A. brasilense* SR80, GSF71 *A. doebereinae*, *A. thiophilum* VSU BV-S, *A. fermentarium* CC-LY743 and *A. melinis* TMCY 0552, and study some properties of their dormant forms. Bacteria in this physiological state are unculturable due to loss of ability to replicate on solid medium, but retain proliferative potential. According to the results of the work, a stepwise procedure for obtaining the resting forms for bacteria of the genus *Azospirillum* was proposed, which opens up the possibility of studying the physiological state of resting forms of *Azospirillum*, and features of its rapid transition from a dormant state to a reproductive state. The procedure is based on a transfer of vegetative cells of *Azospirillum* to a physiological solution (0.9% NaCl) containing 4-n-hexylresorcinol and CuSO<sub>4</sub>. *Azospirillum* bacteria subjected to enormous stress in the course of obtaining their resting forms demonstrated a social behavior. As a result of using advanced microscopy floccules and crystals were detected in the studied cultures. While studying flocculus it was established that they don't only contain cells, but also contain matrices and this actually represents one of the types of biofilms.

**Keywords:** stress, resting culture, *Azospirillum*, floccules, crystals

Азоспириллы (лат. *Azospirillum*) – род бактерий из семейства Rhodospirillaceae класса альфа-протеобактерий, представленный в настоящее время 18 видами. Большинство представителей данного рода являются природными симбионтами высших растений, в том числе пшеницы, риса и других злаков [1, 2]. Азоспириллы относятся к неспорообразующим бактериям и при неблагоприятных условиях формируют цисты.

В последние десятилетия уделяется большое внимание изучению состояния покоя у бактерий и получению некультивируемых форм значимых для человека микроорганизмов [3, 4]. Физиологические переходы покой – размножение у микроорганизмов мало изучены, что связано, прежде всего, с методическими трудностями получения их покоящихся форм. Что касается рода *Azospirillum* – подходы к получению покоящихся бак-

терий были разработаны и опробованы к началу нашей работы только на одном штамме – *A. brasilense* Sp245 [5, 6]. Учитывая тот факт, что штамм Sp245 обладает некоторыми уникальными чертами [1, 5], нельзя быть уверенным, что предложенный для него протокол подойдет для получения некультивируемых клеток других штаммов *A. brasilense*, а также других видов рода *Azospirillum*.

### Цель исследования

Целью работы было получение, с использованием комплекса стрессовых факторов, и частичная характеристика покоящихся культур пяти представителей рода *Azospirillum*: *A. brasilense* SR80, *A. doebereinae* GSF71, *A. thiophilum* VSU BV-S, *A. fermentarium* CC-LY743 и *A. melinis* TMCY 0552.

### Материалы и методы исследования

Объектами исследования были 5 штаммов: *A. brasilense* SR80, *A. doebereinae* GSF71, *A. thiophilum* VSU BV-S, *A. fermentarium* CC-LY743 и *A. melinis* TMCY 0552, полученных из Коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН (г. Саратов, <http://collection.ibppm.ru>). Во всех случаях, за исключением экспериментов по получению покоящихся культур, бактерии культивировали с использованием синтетической малатной среды (СМС) следующего состава (г/л):  $K_2HPO_4 \times 3H_2O$  – 3,0;  $KH_2PO_4$  – 2,0;  $NaCl$  – 0,1;  $NaMoO_4 \times 2H_2O$  – 0,002;  $NaOH$  – 2,24; яблочная кислота – 3,76;  $NH_4Cl$  – 0,5; дрожжевой экстракт – 0,1;  $MgSO_4 \times 7H_2O$  – 0,2;  $CaCl_2 \times 2H_2O$  – 0,02;  $FeSO_4 \times 7H_2O$  – 0,02 (вносили в виде хелата) [6].

Бактерии выращивали при температуре 31°C в жидкой или на твердой СМС, рН среды 6,8. В качестве инокулята во всех экспериментах использовали культуру ранней стационарной фазы роста. Для получения покоящихся культур *A. brasilense* SR80 и *A. doebereinae* GSF71 аликвоту вегетативной культуры вносили в физиологический раствор (0,9%  $NaCl$ ), содержащий 4-н-гексилрезорцин и  $CuSO_4$  в концентрациях 0,3 и 0,4 мМ соответственно. Инокулят вносили в таком объеме, чтобы стартовая плотность бактерий в стрессовых условиях составляла

10<sup>6</sup> кл/мл. Число бактериальных клеток определяли, используя микробиологический стандарт мутности. Для получения бактерий *A. doebereinae*, *A. thiophilum*, *A. fermentarium* и *A. melinis* в физиологическом состоянии покоя использовали  $CuSO_4$  в концентрации 0,3 мМ.

Для оценки колониеобразующей способности покоящихся (дормантных) клеток *Azospirillum* использовали чашечный метод Коха. Учет результатов проводили после 2-суточной инкубации при 31°C. Для оценки возобновления роста покоящихся бактерий в свежей жидкой среде измеряли оптическую плотность культур при длине волны 595 нм на спектрофотометре Spekol 221 («CarlZeiss», Германия).

Световую микроскопию использовали в двух случаях – для контроля чистоты культур *Azospirillum*, а также для изучения возможного флокулообразования и кристаллообразования в исследуемых покоящихся культурах. Во всех случаях использовали препараты, приготовленные методом раздавленной капли. Образцы просматривали на лазерном диссекторе Leica LMD 7000 (Leica-microsystems, Германия) при увеличениях  $\times 40$ ,  $\times 63$ , используя два режима: TL-BF (обычный просмотр) и TL-POL (режим поляризации). Работы проводились в Центре коллективного пользования научным оборудованием в области физико-химической биологии и нанобиотехнологии «Симбиоз» ИБФРМ РАН.

### Результаты исследования и их обсуждение

При получении покоящихся культур пяти видов рода *Azospirillum* за основу был взят подход, предложенный ранее для *A. brasilense* Sp245 [5, 6]. В случае *A. brasilense* SR80 в опубликованный протокол было внесено изменение (исключена одна процедура) – бактерии перед перенесением в условия жесткого стресса не отмывали, т.е. не удаляли факторы межклеточной коммуникации (табл. 1).

Использование модифицированного протокола позволило получить культуру *A. brasilense* SR80, содержащую жизнеспособные, но некультивируемые клетки (ЖНК). Бактерии при этом полностью утрачивали способность к размножению на твердой агаризованной среде СМС.

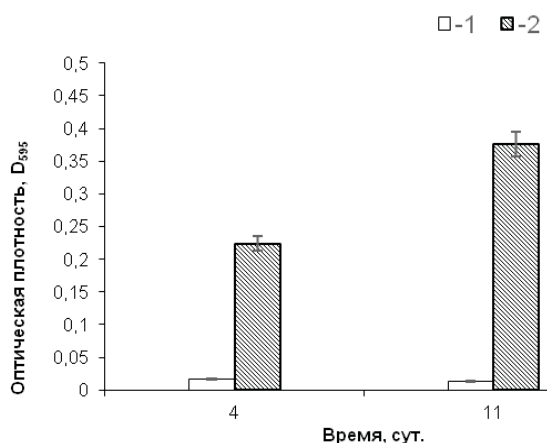
Таблица 1

Стрессовые факторы, использованные для получения некультивируемых клеток *A. brasilense* Sp245 [4] и SR80

№	Стрессовые факторы	Культуры	
		Sp245	SR80
1	Замена оптимальной среды на физиологический раствор	+	+
2	Сниженная стартовая плотность культуры, 10 <sup>6</sup> кл/мл	+	+
3	Удаление факторов межклеточной коммуникации	+	–
4	Гексилрезорцин в среде, мМ	0,3	0,3
5	CuSO <sub>4</sub> в среде, мМ	0,4	0,4

Примечание. Знаки «+» и «–» означают использование/неиспользование указанного стрессового фактора.

Эксперименты по оценке роста в свежей жидкой среде дали следующие результаты. При небольшом сроке действия стресса (от нескольких дней до нескольких недель) покоящиеся *A. brasilense* SR80 возобновляли размножение в свежей жидкой среде, но только в случае использования оптимального инокулята (рис. 1), то есть когда в свежую среду вносили достаточное количество ЖНК-содержащей покоящейся культуры – 10% от объема среды. С течением времени покоящиеся клетки штамма SR80 полностью утрачивали способность переходить к делению в свежей среде без внесения индукторов роста.



1 – инокулят, 5%; 2 – инокулят, 10%

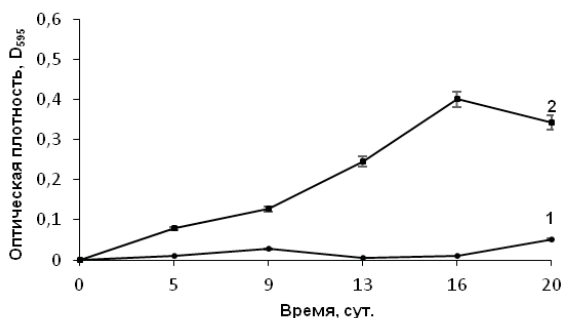
Рис. 1. Возобновление роста покоящихся бактерий *A. brasilense* SR80 при пересеве в свежую жидкую среду СМС при субоптимальном (5%) и оптимальном (10%) инокуляте

В начальных экспериментах по получению покоящихся клеток *A. doebereinaerae* комплекс стрессовых факторов был таким же, как и в случае *A. brasilense* SR80

и Sp245 (табл. 1). В результате было выяснено, что стрессоустойчивость *A. doebereinaerae* GSF71 ниже, чем у штамма SR80 и Sp245 [4, 5]. Ни в одном из проведенных экспериментов не удалось зарегистрировать рост бактерий на твердой и в жидкой среде, что позволило предположить, что все бактериальные клетки погибали под действием стресса. В связи с этим для *A. doebereinaerae* GSF71 и *A. thiophilum* VSU BV-S были взяты более мягкие стрессовые условия: концентрация сульфата меди была снижена с 0,4 мМ до 0,3 мМ. Так как сведения о стрессоустойчивости *A. doebereinaerae* GSF71 и *A. thiophilum* VSU BV-S единичны, покоящиеся культуры каждого из штаммов готовили в двух вариантах: в первом случае в физиологический раствор с добавками 0,3 мМ гексилрезорцина и 0,3 мМ CuSO<sub>4</sub> вносили 10% инокулята, во втором – 1% (от объема среды). В дальнейшей работе эти два варианта обозначали как ПК-1% и ПК-10% (покоящаяся культура с 1% и 10% инокулята соответственно).

Проведенные эксперименты показали, что клетки покоящихся культур *A. doebereinaerae* GSF71 и *A. thiophilum* VSU BV-S утрачивают способность к образованию колоний на твердой агаризованной среде, но размножаются при перенесении в свежую жидкую среду СМС. Колониеобразующую способность dormantных бактерий *A. doebereinaerae* GSF71 и *A. thiophilum* VSU BV-S проверяли трижды. Было установлено, что независимо от начальной плотности культуры (1 или 10 % инокулята) бактерии не образуют колоний на агаризованной синтетической среде (KOE = 0).

Следующим этапом работы было выяснение способности покоящихся бактерий штаммов GSF71 и VSU BV-S переходить к размножению в свежей жидкой среде без дополнительной стимуляции. Варианты *A. doebereinae* GSF71: ПК-1% и ПК-10% (покоящаяся культура с 1% и 10% инокулята, соответственно) пересевали в свежую жидкую СМС и наблюдали за ними в течение 20 сут. Как видно из представленных данных (рис. 2), в случае 10%-ного инокулята бактерии со временем преодолевали стресс и достигали относительно высокой плотности (макс. среднее значение  $D_{595} = 0,4$  через 16 сут.). При пониженной плотности (1% инокулята) оптические показатели роста были низкими (макс. среднее значение  $D_{595} = 0,052$  через 20 сут.).



1 – культура ПК-1%, 2 – культура ПК-10%

Рис. 2. Возобновление роста покоящихся бактерий *A. doebereinae* GSF71 из ПК-1% и ПК-10% в свежей жидкой среде СМС

Несмотря на сходство вариантов ПК-1% и ПК-10% *A. thiophilum* (оба утрачивали колониеобразующую способность), их физиологическое состояние было разным, что проявилось в эксперименте по возобновлению роста бактерий в свежей среде. Покоящиеся клетки ПК-1% не переходили к размножению, в то время как клетки ПК-10% размножались в свежей СМС, достигая достаточно высоких показателей роста ( $D_{595} = 0,45$  через 20 сут.).

Подобные эксперименты были проведены с *A. melinis* TMCY 0552 и *A. fermentarium* CC-LY743, для каждого штамма получены варианты – ПК-1% и ПК-10%. После перенесения вегетативных клеток *A. melinis* TMCY 0552 и *A. fermentarium* CC-LY743 в стрессовые условия

в вариантах ПК-1% и ПК-10% обеих культур наблюдалось увеличение оптической плотности. Это, в свою очередь, позволяет предположить, что на первых этапах формирования покоящихся культур происходило увеличение числа клеток, что хорошо согласуется с литературными данными [7]. Для того чтобы выяснить, утрачивают ли клетки дормантных культур *A. melinis* TMCY 0552 и *A. fermentarium* CC-LY743 колониеобразующую способность, делали высев бактерий на плотную агаризованную среду. Анализировали варианты ПК-1% и ПК-10% обеих культур дважды. Показано, что при увеличении продолжительности стресса покоящиеся культуры не формировали колонии на плотной среде.

Для более полной характеристики ростового потенциала покоящихся культур делали высевы из ПК-1% и ПК-10% *A. melinis* TMCY 0552 и *A. fermentarium* CC-LY743 в жидкую СМС. За ростом бактерий в свежей среде наблюдали в течение 3 недель (визуально и измеряя оптическую плотность). С течением времени культуры *A. melinis* TMCY 0552 и *A. fermentarium* CC-LY743 становились визуально мутными,  $D_{595}$  к концу наблюдения увеличилась в среднем до 0,1, что позволяло сделать вывод о переходе бактерий к делению.

При использовании современной световой микроскопии в покоящихся культурах изученных штаммов пяти видов рода *Azospirillum* были обнаружены флоккулы, значительно варьирующие по размерам (рис. 3).

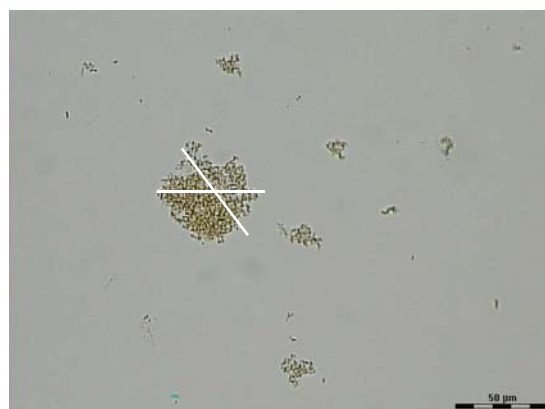
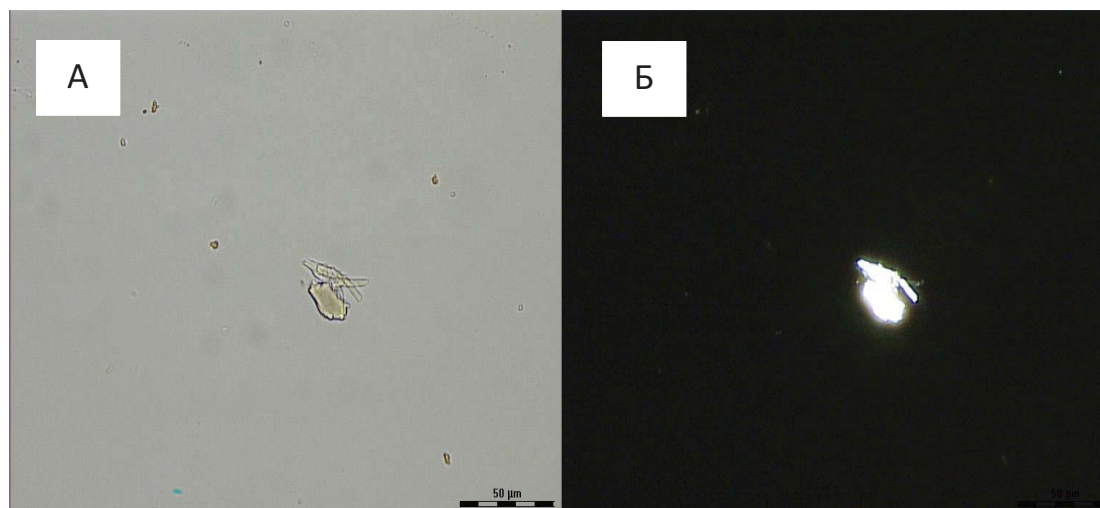


Рис. 3. Световая микроскопия дормантной культуры *A. thiophilum* VSU BV-S. Размеры крупной флоккулы (27×54 мкм)





А – в обычном режиме (TL-BF);  
Б – в режиме поляризации (TL-POL).

Рис. 4. Кристаллы в покоящейся культуре *A. brasilense* SR80

В ряде культур встречались флоккулы двух типов. В первом случае они состояли преимущественно из матрикса, в то время как число покоящихся клеток было невелико. Флоккулы второго типа состояли главным образом из плотно прилегающих друг к другу покоящихся клеток. Культуры разных видов рода *Azospirillum* различались между собой как по количеству свободных клеток, так и по их размерам. В покоящихся культурах *A. brasilense* SR80 и других видов помимо флоккул обнаруживались также и кристаллы (рис. 4).

Их идентификацию проводили с использованием классического подхода – сравнивая изображения объекта в обычной режиме (рис. 4А) и в режиме поляризации (рис. 4Б).

### Выводы

1. С использованием комплекса стрессовых факторов получены покоящиеся культуры представителей пяти видов рода *Azospirillum* – *A. brasilense* SR80, *A. doebereineriae* GSF71, *A. thiophilum* VSU BV-S, *A. fermentarium* CC-LY743 и *A. melinis* TMCY 0552.

2. Установлено, что в покоящихся культурах бактерии полностью утрачивают колониеобразующую способность, но при

этом сохраняют способность возобновлять рост в свежей жидкой среде при оптимальном инокуляте.

3. В покоящихся культурах *A. brasilense* SR80, *A. doebereineriae* GSF71, *A. thiophilum* VSU BV-S, *A. fermentarium* CC-LY743 и *A. melinis* TMCY 0552 выявлено присутствие флоккул и кристаллов.

### Список литературы

1. Cassán F.D. Handbook for *Azospirillum* / Eds. F.D Cassán, Y. Okon, C.M. Creus. –Switzerland: Springer International Publishing, 2015. – 514 p.
2. Bashan Y., de-Bashan L. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth a critical assessment // *Advances in Agronomy*. – 2010. – Vol. 108. – № 2. – P. 77–136.
3. Механизмы выживания бактерий / О.В. Бухарин, А.Л. Гинцбург, Ю.М. Романова, Г.И. Эль-Регистан. – М.: Медицина, 2005. – 367 с.
4. Ding T., Suo Y., Xiang Q., Zhao X., Chen S., Ye X., Liu D. Significance of Viable but Nonculturable *Escherichia coli*: Induction, Detection, and Control // *Microbiol. Biotechnol.* – 2017. – Vol. 27. – № 3. – P. 417–428.
5. Ханадеева М.А. Анализ биотехнологического потенциала бактерий *Azospirillum brasilense* – природных симбионтов пшеницы, с учетом их взаимодействия с лектином растения-хозяина: дис. ... канд. биол. наук. – Саратов, 2015. – 223 с.
6. Факторы, индуцирующие переход ризобактерий *Azospirillum brasilense* от размножения к покою / М.А. Кушнерук [и др.] // *Микробиология*. – 2013. – Т. 82 – № 5. – С. 563–570.
7. Gorshkov V., Petrova O., Gogoleva N., Gogolev Y. Cell-to-cell communication in the populations of enterobacterium *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* SCR11043 during adaptation to stress conditions. *FEMS Immunol // Med. Microbiol.* – 2010. – Vol. 59. – № 3. – P. 378–385.