

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

УДК 579.242:579.841.2

ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ У AZOSPIRILLUM BRASILENSE ШТАММОВ Sp7 И Sp245: СОПРЯЖЕННОСТЬ С СОСТОЯНИЕМ ПОКОЯ И СВОЙСТВА ДИССОЦИАНТОВ

© 2009 г. А. Ю. Погорелова*, А. Л. Мулюкин*,¹ Л. П. Антонюк**,
В. Ф. Гальченко*, Г. И. Эль-Регистан*

*Учреждение Российской академии наук Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН, Москва

**Учреждение Российской академии наук Институт биохимии и физиологии растений
и микроорганизмов РАН, Саратов

Поступила в редакцию 01.11.2008 г.

Установлено, что состояние метаболического покоя у диазотрофных бактерий *Azospirillum brasiliense* Sp7 (неэндофитного штамма) и Sp245 (эндофитного штамма) сопряжено с фенотипической вариабельностью. Последнее проявляется в расширении диссоциативного спектра популяций, вырастающих при рассеивании цистоподобных покоящихся клеток (ЦПК) на плотных средах, и более выражено у штамма Sp7. Основными колониально-морфологическими вариантами штамма Sp7 были: 1) доминантный S-тип; 2) сильно пигментированный Pg-тип; 3) R-тип; 4) образующий мелкие колонии Sm-тип; 5) развивающийся в виде сегментообразных колоний Sg-тип. Помимо колониально-морфологических признаков, диссоцианты различались стабильностью фенотипа при пересевах на стандартной плотной среде и подвижностью клеток в полужидком агаре. Частота появления фенотипических вариантов зависела от условий и сроков инкубации (хранения) ЦПК штамма Sp7, а также от их предобработки перед посевом (прогрев при 55 и 60°C, 10 мин). Максимальная частота переходов S → Pg (до 74%) отмечена при прорастании ЦПК, хранившихся в нативной среде роста при –20°C в течение 4 мес., а S → Sm (до 100%) – при рассеивании ЦПК после термообработки. Наиболее стабильным был Pg-тип, тогда как остальные быстро ревертировали к S- или Pg-вариантам. При росте в полужидком агаре для S-варианта был характерен смешанный тип подвижности (Swa^+Gri^+ – роение и миграция в виде микроколоний); для Pg- и Sg-вариантов – роение (Swa^+Gri^-), для Sm-варианта – отсутствие подвижности (Swa^-Gri^-). Спектр диссоциантов эндофитного штамма Sp245 был менее разнообразным, чем штамма Sp7, и представлен S-, Sm- и M- (мукоидным) вариантами, различающимися подвижностью клеток: у доминантного S-типа – роение (Swa^+Gri^-), у мукоидного M – смешанного типа (Swa^+Gri^+), у Sm – отсутствием подвижности. Различия между неэндофитным Sp7 и эндофитным Sp245 штаммами азоспирилл в способности к фенотипической диссоциации и подвижности клеток в гелеобразных средах могут отражать особенности адаптации к меняющимся условиям окружения и характер взаимоотношений этих бактерий с растениями.

Ключевые слова: фенотипическая вариабельность, цистоподобные покоящиеся клетки, азоспириллы, подвижность клеток диссоциантов.

В исследованиях симбиотических отношений между бактериями и высшими растениями большое внимание привлекают представители грамотрицательных рост-стимулирующих бактерий рода *Azospirillum* [1–4]. Интерес к ним обусловлен способностью занимать разнообразные экологические ниши и успешно переживать неблагоприятные для роста условия за счет реализации гибких стратегий выживания [2]. Одна из таких стратегий состоит в приобретении покоящегося стрессоустойчивого состояния, сопровождающегося образованием цистоподобных покоящихся клеток (ЦПК) нескольких морфотипов [5–7]. Было отмечено, что эндофитный (Sp245) и неэндофитный (Sp7) штаммы *A. brasiliense*

с разным характером взаимоотношений с растительным партнером различались морфотипами покоящихся цистоподобных клеток, образующими при развитии штаммов в одинаковых условиях культивирования [7].

Другой стратегией выживания этих бактерий, меняющихся условиях окружения является фенотипическая диссоциация (вариабельность) микробных популяций, хорошо выявляемая по морфологическим признакам колоний, развивающихся на стандартных плотных средах, или по преимущественному развитию вариантов на селективных средах. Подобная стратегия широко распространена среди бактерий и наилучшим образом выявляется при прорастании покоящихся цистоподобных

¹ Адресат для корреспонденции (e-mail: andlm@mail.ru).

что было продемонстрировано при рассеяхах покоящихся форм бацилл, стафилококков, псевдомонад и других бактерий [9–11]. Представителей рода *Azospirillum* внутрипопуляционная вариабельность хорошо изучена [12–17], но связь с состоянием покоя. Основное внимание в посевах фенотипической диссоциации азоспирилл было уделено признаку подвижности клеток в гелеобразных средах и особенностям поверхностных структур клеток, что определяет способность этих бактерий к колонизации корней растений. Исходя из различий в морфотипах покоящихся клеток, образуемых неэндофитным (Sp7) и эндофитным (Sp245) штаммами *A. brasiliense* в одинаковых условиях роста [7], можно было предположить наличие междуштаммовых различий в проявлении фенотипической диссоциации.

Целью настоящего исследования было проанализировать диссоциативные спектры популяций, выросших при прорастании различающихся морфотипами покоящихся клеток штаммов Sp7 и Sp245 *A. brasiliense*, выделить и охарактеризовать диссоциации азоспирилл.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследований были грамотрицательные бактерии *Azospirillum brasiliense*, штаммы Sp7 (ATCC 29145) и Sp245 из коллекции Института биологии и физиологии растений и микроорганизмов РАН (Саратов). При росте на стандартной среде доминантными для обоих штаммов были S-варианты.

Для культивирования бактерий использовали стандартную синтетическую среду следующего состава (г/л): яблочная кислота – 3.0; дрожжевой экстракт ("Difco") – 0.1; K₂HPO₄ – 3.0; KH₂PO₄ – 2.0; NH₄Cl – 1.5; MgSO₄ · 7H₂O – 0.2; MnSO₄ · H₂O – 0.1; CaCl₂ – 0.02; FeSO₄ · 7H₂O – 0.02; Na₂MoO₄ · 2H₂O – 0.002; pH 7.0. Бактерии культивировали в колбах объемом 250 мл (50 мл среды) при 32°C на качалке (120 об/мин) в течение 72 ч до достижения стационарной фазы.

Микроскопические наблюдения проводили с использованием микроскопа Zetopan ("Reichert", Австрия), снабженного фазово-контрастным устройством.

Способы получения и хранения ЦПК подробно описаны в нашей предыдущей работе [7]. Жизнеспособность (КОЕ) вегетативных и покоящихся клеток азоспирилл определяли высевом клеточных супензий в соответствующих десятикратных разведениях на агаризованную среду (1.5% агара) приведенного выше состава. Посевы инкубировали при 32°C в течение 14 сут. Термоустойчивость клеток определяли по сохранению ими жизнеспособности после прогревания клеточных супензий (0.7 мл) в

ультратермостате при температуре 55°C или 60°C в течение 10 мин.

При подсчете числа выросших колоний учитывали процентную долю колоний (индекс диссоциации), отличающихся по форме, размеру, консистенции и пигментации от доминантного типа, и отсевали их. Стабильность выделенных клонов определяли по сохранению ими колониально-морфологических признаков после 3 последовательных пассажей на плотной среде, а также после последовательного культивирования в жидкой среде (до стационарной фазы, 72 ч) с пересевом на плотную среду. О характере подвижности клеток вариантов судили по морфотипам колоний, выросших при посевах бактерий уколом в полужидкую среду (0.5% агара) в соответствии с [15].

Повторность измерений в экспериментах трехкратная при постановке 3 независимых серий опытов. Статистический анализ данных проводили с использованием теста Стьюдента, принимая достаточным критерий вероятности $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Способность к фенотипической диссоциации обоих штаммов *A. brasiliense* Sp7 и Sp245 оценивали по появлению и количеству колоний с различающимися колониально-морфологическими признаками при рассеве супензий цистоподобных покоящихся клеток (ЦПК), сформировавшихся при росте азоспирилл в стандартной среде с пятикратно сниженным содержанием источника азота [7] и хранившихся в разных условиях: супензирование отмытых клеток в физрастворе (ФР), инкубация при 18–20°C (вариант 1); в нативной среде роста, инкубация при комнатной температуре (вариант 2); в ФР, хранение при –20°C (вариант 3); в нативной среде роста, хранение при –20°C (вариант 4).

Фенотипическая диссоциация *A. brasiliense* Sp7. Фенотипическая вариабельность популяций, выросших при рассеве ЦПК, зависела от сроков и условий их хранения. В контрольных вариантах, при посеве на плотную среду клеток трехсуточных стационарных культур штамма Sp7, развивающихся при снижении стартового уровня источника азота, преобладал доминантный S-тип (96%), миорными были сильно пигментированный Pg-тип (3%) и R-тип (1%) (табл. 1). Численность жизнеспособных клеток составляла 2×10^8 КОЕ/мл.

Диссоциативные спектры популяций, развивающихся на плотной среде из ЦПК на начало их хранения – 7 сут, не отличались от контрольных (для стационарной культуры) и были схожими для ЦПК всех вариантов хранения. Термообработка (55 и 60°C, 10 мин) ЦПК 7-дневного хранения всех вариантов приводила к снижению численности КОЕ на 4 порядка и обуславливала изменения диссоциативных спектров. Это выражалось в преимуществен-

Таблица 1. Описание фенотипических диссоциантов *A. brasiliense* Sp7 (неэндофитный штамм) и оптимальные условия их появления

Тип	Описание	Вид диссоцианта*	Условия максимального проявления		Тип подвижности
			Вариант ЦПК/условия	Частота	
S	Округлые колонии палевого цвета с гладкой поверхностью и ровными краями		Культуры стационарной фазы	96%	Swa ⁺ Gri ⁺
Pg	Округлые сильно пигментированные темно-бурые колонии с гладкой поверхностью и ровными краями		ЦПК варианта 4 (хранение 4 мес.) без прогревания	74%	Swa ⁺ Gri ⁻
R	Округлые колонии палевого цвета с шероховатой поверхностью		ЦПК варианта 1 (инкубация 14 сут)	11%	Н.о.
Sm	Мелкие колонии (d 0.3–0.7 мм) кремового цвета с гладкой поверхностью и ровными краями		ЦПК варианты 3–4 (хранение 4 мес.) после прогревания при 60°C	100%	Swa ⁻ Gri ⁻ , 60% колоний этого варианта сливаются на плотной среде
Sg	Колонии продолговатой формы кремового цвета с сегментообразным ростом		ЦПК варианта 1 (инкубация 4 мес.) без прогревания	31%	Swa ⁺ Gri ⁻
PgCr	Сильно пигментированные бурые колонии, образующие внеклеточные кристаллы в толще агара		ЦПК варианта 4 (хранение 4 мес.) без прогревания	2%	Swa ⁺ Gri ⁺

* Длина метки, 5 мм.

Н.о. – не определяли.

ном развитии Sm-варианта (табл. 1), дающего мелкие колонии на 3 сут инкубации и приобретающего бурую пигментацию на 10 сут инкубации. Частота появления Sm-типа составляла от 67 до 95% в зависимости от варианта хранения ЦПК (для варианта 1 – иллюстрировано на рис. 1, и для всех вариантов в табл. 2). В популяциях, выросших из прогретых ЦПК, помимо Sm-диссоцианта развивались Sg-диссоциант с “сегментообразным” характером роста колоний (табл. 1), а также сильно пигментированный Pg-тип, доля которых достигала 13 и 18% соответственно, в разных вариантах хранения ЦПК (рис. 1, табл. 2).

Увеличение физиологического возраста ЦПК до 14 сут сопровождалось дальнейшими изменениями диссоциативного спектра популяций, выросших при их посевах. В вариантах 1 и 4 хранения ЦПК для Pg-типа возрастала до 47 и 59% соответственно, и в варианте 1 появлялись колонии R-типа (11%). Термообработка (55 и 60°C, 10 мин) ЦПК этого срока хранения также приводила к преимущественному развитию колоний Sm-типа. Анализ свойств ЦПК, хранившихся длительное время (11 мес.) в разных условиях, подтвердил [7], что сохраненные колониеобразующей способности покоящихся форм способствуют их инкубация при низких тем-

температурах в нативной среде роста, тогда как число термостабильных клеток было больше в популяции, хранившихся в нативной среде роста при комнатной температуре. При этом тенденция к изменению диссоциативного спектра сохранялась.

Посев 4-месячных ЦПК в варианте хранения 1 (ФР, 18–20°C) продемонстрировал снижение на 1 порядок численности жизнеспособных клеток, а также увеличение доли R-типа (до 18%) и появление мажорных Sg-типа с сегментообразным ростом колоний и подтипа SmCr, образующего мелкие колонии и кристаллы в толще агара, помимо доминантного S-диссоцианта. В этом варианте хранения доля ЦПК, устойчивых к прогреванию в течение 10 мин при 55°C (но не 60°C), была низкой, и при посеве на плотной среде все они давали колонии Sm-типа (рис. 1, табл. 2).

В 4-месячных суспензиях ЦПК в варианте хранения 2 (нативная среда роста, 18–20°C), в отличие от данных для варианта 1, наблюдалось снижение числа КОЕ (на 2 порядка) одновременно с существенным увеличением доли терморезистентных ЦПК (27 и 1.5 % от титра КОЕ в непрогретых суспензиях после обработки при 55 и 60°C соответственно). Диссоциативный спектр хранившейся популяции ЦПК изменился: в начале хранения (7 сут) он был представлен S(95%)-, R(3%)- и Pg(2%)-типами, а через 4 мес. доля Pg-типа возросла до 18% за счет снижения числа S-типа и элиминации R-типа. Отмечено, что в популяциях, выросших из прогретых ЦПК, вне зависимости от сроков их хранения (7 сут или 4 мес.) преимущественное развитие получил Sm-тип (табл. 2).

Схожий характер изменений диссоциативного спектра популяций ЦПК, хранившихся 7 сут и 4 мес., был отмечен для варианта 3 (ФР, –20°C), доля Pg-типа в популяции возросла. После термообработки хранившихся ЦПК в их популяциях доминировал Sm-тип (табл. 2).

Хранение ЦПК в варианте 4 (нативная среда, –20°C) обеспечивало высокую сохранность численности КОЕ (57% от титра КОЕ стационарной культуры, для сравнения – в вариантах хранения 1, 2, 3 число КОЕ составляло 5, 0.7, 2% соответственно). Диссоциативный спектр 4-месячной популяции ЦПК в варианте хранения 4 также существенно отличался от спектров популяций ЦПК, хранившихся в вариантах 1–3 и был представлен, в основном, колониями Pg-типа при снижении доли S-типа и появлении мажорного диссоцианта PgCr, сильно пигментированного и образующего внеклеточные кристаллы. После термообработки (55°C, 10 мин) ЦПК варианта 4 в диссоциативном спектре в равной доле с Sm-типом появился новый диссоциант PgSm-тип с мелкими темно-бурыми колониями (табл. 2).

Таким образом, показано, что прорастание ЦПК неэндофитного штамма *A. brasiliense* Sp7 сопряжено с повышенной фенотипической вариабельностью, а

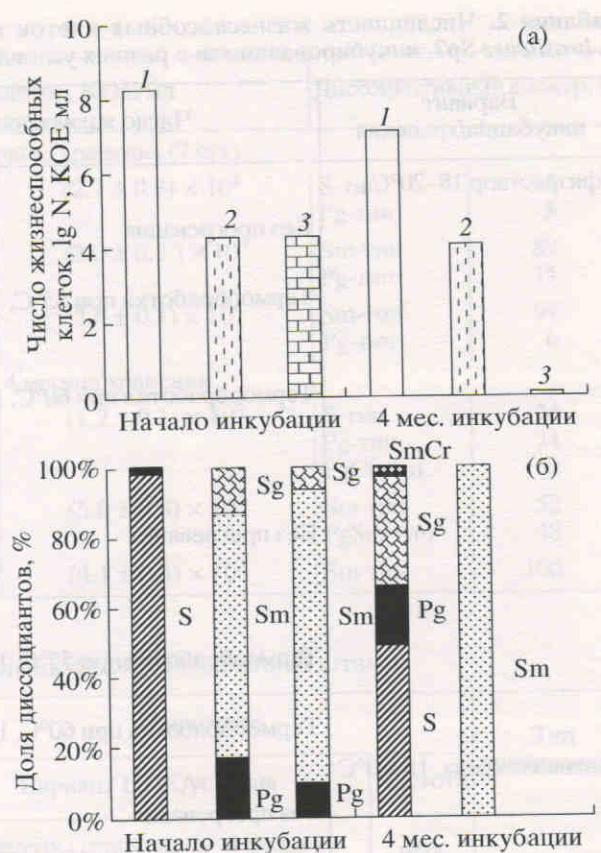


Рис. 1. а – Численность жизнеспособных клеток ($\lg N$, КОЕ/мл) в контроле (столбы 1) и после термообработки (10 мин) при 55°C (2) и 60°C (3) и б – частота появления диссоциантов (%) в соответствующих условиях при прорастании ЦПК *A. brasiliense* Sp7 на начальный момент и через 4 мес. инкубации в физрастворе при 18–20°C, вариант 1.

спектр диссоциантов, выявляемых при рассеве ЦПК на плотной среде в одинаковых условиях роста, определяется условиями и сроками хранения покоящихся форм.

Фенотипическая диссоциация *A. brasiliense* Sp245. Зависимость изменения диссоциативного спектра популяций прорастающих покоящихся форм цистоидного типа от сроков и условий их хранения показаны для другого, эндофитного, штамма азоспирилл Sp245. В контрольных вариантах при посеве на плотную среду клеток культуры стационарной фазы (титр КОЕ/мл 1.1×10^8 – 1.6×10^8), развивающейся в среде со сниженным уровнем источника азота (так же, как штамма Sp7), в выросшей популяции доминировал S-вариант (95%) и обнаруживались слизистые колонии мажорного мукOIDного M-типа (5%) (табл. 3). Численность жизнеспособных ЦПК, инкубировавшихся в физрастворе в течение 6 мес. при комнатной температуре (18–20°C), снизилась на 2 порядка и составила 4.5×10^6 КОЕ/мл (2.7–4% от численности в стационарной культуре). При прорас-

Таблица 2. Численность жизнеспособных клеток и частота появления диссоциантов при прорастании ЦПК *A. brasiliense* Sp7, инкубировавшихся в разных условиях

Вариант инкубации/хранения	Число жизнеспособных клеток, КОЕ/мл	Диссоциативный спектр, %	
1/физраствор 18–20°C	Начало инкубации (7 сут)		
	Без прогревания	(2.1 ± 0.3) × 10 ⁸	S-тип 97 Pg-тип 3
	Термообработка при 55°C, 10 мин	(2.0 ± 0.2) × 10 ⁴	Sm-тип 67 Pg-тип 17 Sg-тип 13
	Термообработка при 60°C, 10 мин	(2.0 ± 0.1) × 10 ⁴	Sm-тип 84 Pg-тип 10 Sg-тип 6
	4 месяца инкубации		
	Без прогревания	(1.1 ± 0.1) × 10 ⁷	S-тип 48 Sg-тип 31 Pg-тип 18 SmCr-тип 4
	Термообработка при 55°C, 10 мин	(1.4 ± 0.1) × 10 ⁴	Sm-тип 100
	Термообработка при 60°C, 10 мин	0	—
2/нативная среда, 18–20°C	Начало инкубации (7 сут)		
	Без прогревания	(2.1 ± 0.3) × 10 ⁸	S-тип 95 R-тип 3 Pg-тип 2
	Термообработка при 55°C, 10 мин	(2.0 ± 0.2) × 10 ⁴	Sm-тип 72 Pg-тип 18 Sg-тип 10
	Термообработка при 60°C, 10 мин	(2.0 ± 0.1) × 10 ⁴	Sm-тип 90 Pg-тип 10
	4 месяца инкубации		
	Без прогревания	(1.6 ± 0.3) × 10 ⁶	S-тип 75 Pg-тип 25
	Термообработка при 55°C, 10 мин	(4.3 ± 0.4) × 10 ⁵	Sm-тип 88 S-тип 12
	Термообработка при 60°C, 10 мин	(1.9 ± 0.2) × 10 ⁴	Sm-тип 83 Pg-тип 17
3/физраствор, -20°C	Начало хранения (7 сут)		
	Без прогревания	(2.1 ± 0.3) × 10 ⁸	S-тип 96 Pg-тип 4
	Термообработка при 55°C, 10 мин	(2.0 ± 0.2) × 10 ⁴	Sm-тип 90 Pg-тип 10
	Термообработка при 60°C, 10 мин	(2.0 ± 0.1) × 10 ⁴	Sm-тип 95 Pg-тип 5
	4 месяца хранения		
	Без прогревания	(4.0 ± 0.6) × 10 ⁶	S-тип 74 Pg-тип 26
	Термообработка при 55°C, 10 мин	(2.6 ± 0.4) × 10 ³	Sm-тип 89 S-тип 11
	Термообработка при 60°C, 10 мин	(1.9 ± 0.4) × 10 ³	Sm-тип 100

Таблица 2. Окончание

Вариант инкубации/хранения	Число жизнеспособных клеток, КОЕ/мл	Диссоциативный спектр, %		
Среда, -20°C		Начало хранения (7 сут)		
97	Без прогревания	$(2.1 \pm 0.3) \times 10^8$	S-тип	95
3	Термообработка при 55°C, 10 мин	$(2.0 \pm 0.2) \times 10^4$	Pg-тип	5
67	Термообработка при 60°C, 10 мин	$(2.0 \pm 0.1) \times 10^4$	Sm-тип	89
17			Pg-тип	11
13			Sm-тип	94
84			Pg-тип	6
10	4 месяца хранения			
6	Без прогревания	$(1.2 \pm 0.1) \times 10^8$	S-тип	24
48	Термообработка при 55°C, 10 мин	$(5.0 \pm 0.8) \times 10^3$	Pg-тип	74
31			PgCr-тип	2
18			Sm-тип	52
4	Термообработка при 60°C, 10 мин	$(4.1 \pm 0.3) \times 10^3$	PgSm-тип	48
100			Sm-тип	100

Таблица 3. Свойства фенотипических диссоциантов *A. brasiliense* Sp245 (эндофитный штамм)

Описание	Вид диссоцианта*	Появление		Тип подвижности
		Вариант ЦПК/условия	Частота	
Округлые палевые колонии с гладкой поверхностью и ровными краями		Культуры стационарной фазы на обычной среде и с дисбалансом C : N	95%	
Мелкие полупрозрачные колонии (d 0.3–0.7 мм) с гладкой поверхностью и ровными краями		Суспензии ЦПК (рост при дисбалансе C : N, перенесение в физраствор, инкубация 6 мес.)	55%	Swa ⁺ Gri ⁻
Белые колонии со слизистой поверхностью, выступающим центром и неровными краями		Тот же вариант после термообработки при 55°C	10%	
		Суспензии ЦПК (рост при дисбалансе C : N, перенесение в физраствор, инкубация 6 мес.)	35%	Swa ⁺ Gri ⁺
		Тот же вариант после термообработки при 55°C	70%	
		Суспензии ЦПК (рост при дисбалансе C : N, перенесение в физраствор, инкубация 6 мес.)	10%	
		Тот же вариант после термообработки при 55°C	20%	Swa ⁺ Gri ⁺

* Длина метки 3 мм.

таний на плотной среде этих длительно хранящихся покоящихся клеток, помимо S- и M-вариантов (55 и 10% соответственно), выявлялся диссоциант Sm-типа (35%), дающий мелкие колонии (табл. 3).

Термообработка шестимесячных суспензий ЦПК штамма Sp245 (55°C, 10 мин), обусловливала снижение численности жизнеспособных клеток до 1.1×10^4 КОЕ/мл (на 2 порядка по сравнению с не-

прогретыми суспензиями) и возрастание доли Sm-диссоцианта до 70% и M-диссоцианта до 20% при одновременном снижении доли доминантного S-типа до 10% (табл. 3). Аналогичное соотношение диссоциантов отмечено при развитии на плотной среде популяций ЦПК, подвергнутых прогреванию при 60°C, хотя доля оставшихся жизнеспособными клеток была крайне низкой (100 КОЕ/мл). Следует отметить, что, в отличие от бактерий штамма Sp7, популяционный спектр штамма Sp245 был беден: в других вариантах получения (на синтетической среде с лимитом азота) и хранения (в физрастворе, на тивной среде роста, при комнатной температуре или в замороженном состоянии) ЦПК эндофитного штамма азоспирилл иных колониально-морфологических вариантов выявлено не было.

Таким образом, неэндофитный (Sp7) и эндофитный (Sp245) штаммы *A. brasiliense* различаются не только эффективностью образования и разнообразием морфотипов покоящихся клеток, формирующихся в неблагоприятных для роста условиях [7], но и свойствами покоящихся форм. Это проявляется при анализе фенотипической диссоциации популяций, развивающихся при прорастании покоящихся клеток этих бактерий, прежде всего, в качественном отношении, по разнообразию выявленных в стандартных условиях колониально-морфологических вариантов (табл. 1 и 3). Можно полагать, что наличие более широкого диссоциативного спектра у неэндофитных азоспирилл (по сравнению с эндофитными) обусловливает большие возможности адаптивных реакций в условиях сапротрофного роста и в ответ на действие неблагоприятных факторов (в настоящем исследовании имитированных термообработкой). Изменения диссоциативного спектра популяций *A. brasiliense*, наблюдаемые при входжении покоящихся форм азоспирилл в новый цикл развития, можно рассматривать как один из важных механизмов приспособления бактерий к новым условиям окружения.

Характеристика диссоциантов *A. brasiliense*. Различия свойств диссоциантов определяют диапазон толерантности развития бактериальной популяции по многим параметрам условий роста. Следующие эксперименты были направлены на выявление различий между диссоциантами *A. brasiliense* Sp7 и Sp245, особенно, по показателям подвижности как экологическому признаку, определяющему способность этих бактерий взаимодействовать с растительным партнером. Отметим, что условия роста оказывают селектирующее влияние на развитие определенных диссоциантов, тогда как стандартные условия выявляют стабильность свойств.

В экспериментах было показано, что диссоцианты штамма Sp7 различались стабильностью сохранения колониально-морфологических признаков при последовательных пассажах на плотные среды

или при чередовании культивирования в жидкой среде до достижения стационарной фазы (3 сут) с посевом аликовт культур на агар. Так, в первом пассаже на плотной среде Pg-вариант полностью (100%) сохранял основной признак – способность к образованию характерного для него бурого пигмента, но при пересевах наблюдалась реверсия Pg-типа к доминантному на 65 и 95% во 2 и 3 пассажах соответственно. При культивировании в жидкой среде с последующим посевом на плотную частота перехода Pg → S составила 67%. Диссоциант Sm при первом пассаже на плотную среду только на 5% сохранял свойство к образованию мелких колоний, ревертируя к S и Pg-типам на 45 и 50% соответственно, и полностью замещался этими типами при дальнейших пересевах. С аналогичной частотой происходила реверсия Sm → Pg и Sm → S при пассаже “жидкая культура–плотная среда”, о чем судили при учете колоний после посева 10⁵-кратно разведенных суспензий. Однако при посеве менее разведенных (в 10⁴ раз) суспензий основная часть колоний (91%) была представлена Sm-вариантом, хотя численность колоний на стандартной чашке Петри не превышала 150. Вариант Sg-типа не был стабильным и при обеих схемах пассирования практически полностью переходил в доминантный S- или Pg-тип уже после второго пересева.

Таким образом, при росте в стандартных условиях, благоприятных для развития S-типа, Pg-вариант выдерживал большее число пассажей, по сравнению с остальными диссоциантами, но все они в конечном итоге ревертировали к исходному S-типу. Выявленную обратимость диссоциативных переходов правомочно рассматривать как аргумент, исключающий контаминацию посторонней микрофлорой и подтверждающий принадлежность колониально-морфологических вариантов штамму *A. brasiliense* Sp7.

Другой уровень различий диссоциантов *A. brasiliense* Sp7 проявлялся в их подвижности в полужидкой среде с 0,5% агара. В целом, для доминантного S- и PgCr-вариантов, различающихся морфологией колоний, был характерен смешанный тип подвижности (Swa⁺Gri⁺), т.е. роение и миграция в виде микроколоний (рис. 2а, 2в). Тип подвижности Gri группами клеток преобладал у PgCr-варианта (рис. 2в), при этом распространение клеточных скоплений, остановившихся и образовавших бурые колонии, было неравномерным, что предполагает фенотипическую неоднородность этого диссоцианта. Варианты Pg-типа (рис. 2б), а также Sg- и ряд морфных вариантов (табл. 1) характеризовались способностью только к роению, Swa⁺Gri⁻-типу подвижности. Хотя Sm-тип не обладал стабильностью колониально-морфологических признаков при пересевах, его следует считать диссоциантом, так как

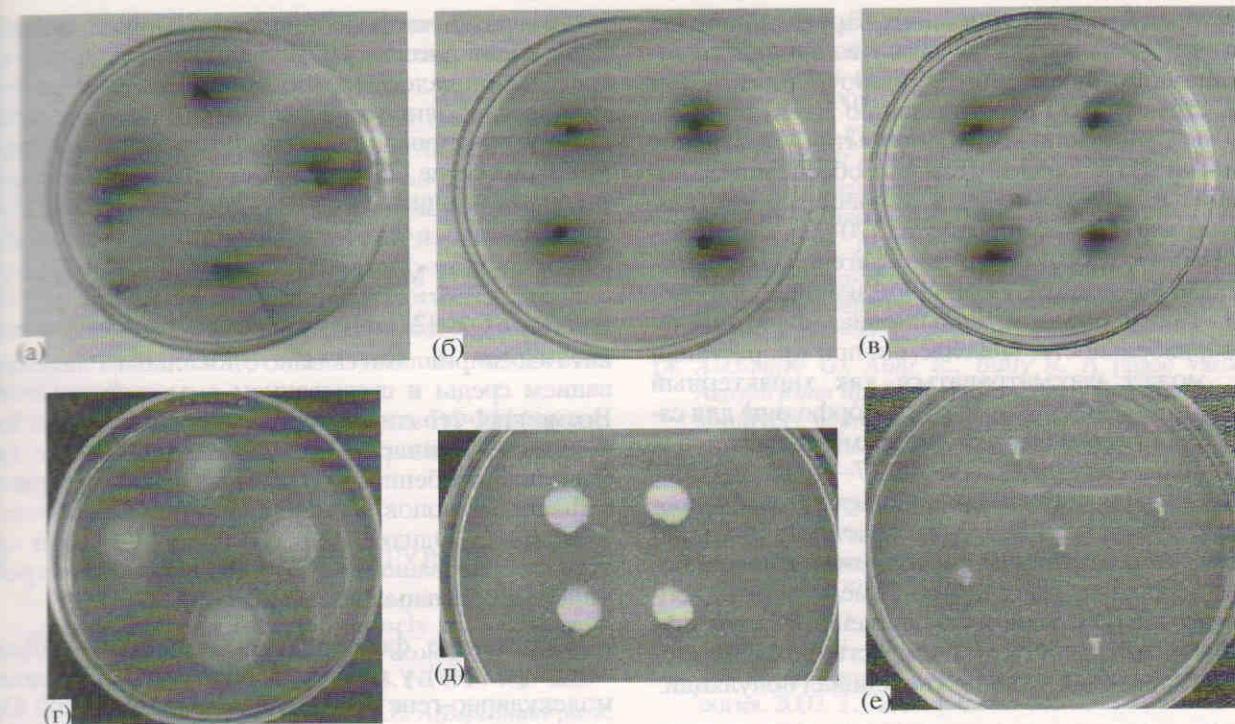


Рис. 2. Характер подвижности вариантов *A. brasiliense* в полужидком агаре: штамма Sp7: S-типа (а), Pg-типа (б), PgCr-типа (в) и штамма Sp245: S-типа (д), Sm-типа (е). Обозначения диссоциантов приведены в табл. 1 и 2.

вариант отличался от других диссоциантов отсутствием подвижности (Swa^+Gri^- -тип) в полужидком агаре.

Аналогичные отличия в типе подвижности клеток были выявлены между вариантами S-, M- и Sm-типов эндофитного штамма Sp245 азоспирилл (табл. 3). Для доминантного S-варианта был характерен Swa^+Gri^- -тип роения, для мукоидного (M) – Swa^+Gri^+ -тип подвижности, при котором колонии роения окружали мелкие колонии, развивающиеся из мигрировавших групп клеток (рис. 2г, 2д). В отличие от них Sm-вариант не обладал подвижностью в полужидком агаре (Swa^+Gri^-), при посеве уколом в толще агара выявлялись микроколонии (рис. 2е), развивавшиеся вдоль точки укола к поверхности. Суперроющихихся вариантов эндофитного штамма не выявлено.

Таким образом, внутрипопуляционные диссоцианты эндофитного и неэндофитного штаммов *A. brasiliense*, выщепляющиеся при прорастании цистоподобных покоящихся форм этих бактерий, различались не только морфологическими признаками, но и типами подвижности клеток, определяющей успешность колонизации ризосферы растений этими бактериями.

ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты настоящей работы демонстрируют, что симбиотрофным бактериям рода *Azospirillum*,

так же как и сапротрофным бактериям [8–11, 18, 19], свойственна сопряженность состояния метаболического покоя с повышением уровня внутрипопуляционной фенотипической вариабельности. Как неэндофитный (Sp7), так и эндофитный (Sp245) штаммы *A. brasiliense* оказались способны к образованию цистоподобных клеток [5–7], предназначенных для выживания вида, при прорастании и входжении в новый цикл развития которых реализуется диссоциативная активность популяции. Оба свойства являются составляющими единого адаптационного механизма, обеспечивающего сохранение популяции (вида) в новых или неблагоприятных для роста условиях.

Способность к фенотипической диссоциации зависела от условий и сроков хранения ЦПК *A. brasiliense* Sp7 и Sp245 (рис. 1, табл. 2). Этот вывод включает два подыввода. Первый – это подтверждение на новых объектах (симбиотрофных бактериях) феномена генотипической нестабильности ЦПК, что проявляется в фенотипической вариабельности вырастающей из них популяции. Это важное для адаптационных возможностей вида свойство ЦПК (по сравнению с другими формами покоя, например, эндоспорами) было ранее отмечено при анализе колониально-морфологических спектров популяций, выросших при рассеивании ЦПК *Bacillus cereus* [9], *B. licheniformis* [19], *Pseudomonas aurantiaca*, *P. fluorescens* [11] и других. Другой подыввод основан на том, что условия хранения ЦПК в настоящей

работе предусматривали в одних вариантах (нативная среда, температура 18–20°C) возможность созревания покоящихся клеток, включающих, в том числе, структурную реорганизацию ДНК, в других (ФР, –20°C) – исключали эти события. Изменения топологии ДНК, с одной стороны, обеспечивает повышение ее стабильности в покоящихся клетках, что отмечено во многих работах [20–22], с другой – по-видимому, способствует внутригеномным перестройкам, являющимся причиной изменения фенотипов. Таким образом, повышенная фенотипическая вариабельность, выявляемая при прорастании ЦПК, может рассматриваться как характерный признак покоящихся форм этого морфотипа для сапротрофных и симбиотрофных грамотрицательных и грамположительных бактерий [7–11, 18, 19]. Поскольку цистоподобные покоящиеся клетки широко распространены в природных системах [8, 23, 24] и рассматриваются как форма переживания азоспирелл в зерновках растений при смене вегетационных периодов [25], свойство повышенной фенотипической вариабельности при прорастании ЦПК входит в суммарный адаптивный потенциал популяций.

Это положение дополнительно иллюстрируется результатами наших экспериментов, показавших, что повреждающие воздействия (термообработка при 55°C и 60°C, 10 мин) практически полностью элиминировала развитие доминантных фенотипов, дающих S- или Pg-тип колоний у штамма Sp7, а высшая популяция была представлена мелкими колониями Sm- и PgSm-типов, не обнаруживаемых в популяциях, развивающихся из непрогретых суспензий (табл. 2). В аналогичных условиях термообработки также наблюдалась элиминация доминантного S-типа штамма Sp245, и преимущественное развитие получил Sm-вариант. Сопоставление изменений величин КОЕ в прогретых суспензиях ЦПК и индекса диссоциации при их рассеве не позволяет сделать заключение о предпочтительном селектирующем или индуцирующем влиянии термообработки на развитие Sm-варианта. Следует отметить, что Sm-вариант, клетки которого не обладали подвижностью в полужидком агаре (табл. 1 и 3, рис. 2), не обладал стабильностью в стандартных условиях роста и быстро revertировал к доминантным S- и Pg-типу. Таким образом, в популяции быстро восстанавливалась способность клеток к передвижению в гелеобразных средах, составляющая важное свойство для колонизации бактериями растения. Важно подчеркнуть, что применение термообработки в наших экспериментах позволило расширить диссоциативный спектр вырастающих из ЦПК популяций за счет проявления Sm-фенотипа. Подбор условий, способствующих селективному выщеплению определенного диссоцианта, который может не проявляться в стандартных условиях посева, имеет практическое значение для поиска вариантов с желаемыми признаками.

При развитии фенотипических вариантов SmCr и PgCr после рассева ЦПК штамма Sp7 на плотной среде наблюдалось образование в толще агара крупных внеклеточных кристаллов, что ранее отмечено при культивировании *A. brasiliense* Sp245 в жидкой малатной среде [26, 27]. Эти кристаллы представлены модификациями струвита $MgNH_4PO_4 \cdot 6H_2O$ [26], содержащего в качестве примесных компонентов Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mn^{2+} , $Fe^{2+/3+}$ и анионов Cl^- , HPO_4^{2-} , $H_2PO_4^-$, SO_4^{2-} [27]. По-видимому, образование струвита азоспиреллами связано с локальным защелачиванием среды и связыванием аммонийного азота. Возможно, что способность к образованию внеклеточных кристаллов отражает специфические трофические особенности и наличие механизма детоксикации ионов аммония у этих диссоциантов азоспирелл. Однако вопрос о природе и роли кристаллообразования у SmCr- и PgCr-вариантов требует дополнительных исследований.

Обратимые фенотипические переходы (фазовые вариации) у бактерий обусловлены разными молекулярно-генетическими механизмами [28]. При этом появление аналогичных диссоциантов у бактерий разных видов и штаммов может быть следствием различных внутригеномных перестроек. Так, фазовый переход с образованием неподвижного варианта, первоначально описанный у *A. lipoferum* [13], затем у азоспирелл других видов, коррелировал с изменением плазмидного профиля: исчезновение плазмиды размером 750 т.п.н. у *A. lipoferum* 4B; плазмиды 260 т.п.н. – у *A. brasiliense* WN1, но наличие хотя и измененной (удалением фрагмента 160 т.п.н.) плазмиды 1400 т.п.н. у *A. irakense* KBC1 [17]. Диссоциант S-типа *A. brasiliense* Sp7 отличался от R-варианта отсутствием плазмиды 115 МДа [12], а нетипичная диссоциация R → S у этого штамма была связана с перераспределением вкладов двух О-специфических полисахаридов в архитектуру клеточной поверхности у обоих вариантов в зависимости от возраста культур [16]. Также выявлены различия по способности образовывать биопленки между бактериями родительского штамма *A. brasiliense* Sp245 и спонтанными мутантами, дефектными по синтезу липополисахаридов и утратившими плазмиду R и резидентные плазмиды p85 и p120 [29].

Наконец, еще одним важным выводом является выявление различий между неэндофитным (Sp7) и эндофитным (Sp245) штаммами *A. brasiliense* в разнообразии фенотипов диссоциативного спектра, дополнительно к ранее показанным штамм-специфическим особенностям в образовании ЦПК в физиологических условиях культивирования [7]. По-видимому, повышенная фенотипическая вариабельность неэндофитного штамма Sp7, проявляющаяся в выщеплении большего числа диссоциантов при прорастании ЦПК, обеспечивает гибкую стратегию

зования, с учетом того, что у штамма Sp7 связь с хозяином менее выражена, чем у эндотропного штамма Sp245.

В целом, способность бактерий *A. brasiliense* к обитанию разных морфотипов цистоподобных покоящихся клеток, различающихся по длительности проявления жизнеспособности и термоустойчивости [5–7], а также потенции к фенотипической диссоциации с выплесением колониально-морфологических вариантов с разными физиологическими возможностями, расширяют представления о механизме выживания этих бактерий в природных экосистемах.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проекты 07-04-01011 и 08-04-00164) и гранта Президента РФ (проект НШ-676177.2006.4).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Steenhoudt O., Vanderleyden J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects // FEMS Microbiol. Rev. 2000. V. 24. № 4. P. 487–506.
2. Bashan Y., Holguin G., de-Bashan L.E. *Azospirillum*-plant: Physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997–2003) // Can. J. Microbiol. 2004. V. 50. P. 521–577.
3. Молекулярные основы взаимоотношений ассоциативных микроорганизмов с растениями / Под ред. Игнатова В.В. М.: Наука, 2005. 262 с.
4. Baldani J.I., Baldani V.L.D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience // Anals da Academia Brasileira de Ciências. 2005. V. 77. № 3. P. 549–579.
5. Sadasivan L., Neyra C.A. Flocculation in *Azospirillum brasiliense* and *A. lipoferum*: exopolysaccharides and cyst formation // J. Bacteriol. 1985. V. 163. № 2. P. 716–723.
6. Sadasivan L., Neyra C.A. Cyst production and brown pigment formation in aging cultures of *Azospirillum brasiliense* ATCC 29145 // J. Bacteriol. 1987. V. 169. № 4. P. 1670–1677.
7. Мулюкин А.Л., Сузина Н.Е., Погорелова А.Ю., Антонюк Л.П., Дуда В.И., Эль-Регистан Г.И. Разнообразие морфотипов покоящихся клеток и условия их образования у *Azospirillum brasiliense* // Микробиология. 2009. Т. 78. № 1. С. 42–51.
8. 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.
9. Дорошенко Е.В., Лойко Н.Г., Ильинская О.Н., Колпаков А.И., Горнова И.В., Эль-Регистан Г.И. Характеристика диссоциантов *Bacillus cereus* шт. 504 // Микробиология. 2001. Т. 70. № 6. С. 811–819.
10. Ильинская О.Н., Колпаков А.И., Шмидт М.А., Дорошенко Е.В., Мулюкин А.Л., Эль-Регистан Г.И. Роль бактериальных ауторегуляторов роста группы алкилоксибензолов в ответе стафилококков на стрессовые воздействия // Микробиология. 2002. Т. 71. № 1. С. 23–29.
11. Мулюкин А.Л., Козлова А.Н., Эль-Регистан Г.И. Свойства фенотипических диссоциантов бактерий *Pseudomonas aurantiaca* и *P. fluorescens* // Микробиология. 2008. Т. 77. № 6. С. 766–776.
12. Матвеев В.Ю., Петрова Л.П., Журавлева Е.А., Панасенко В.И. Особенности диссоциации в культурах *Azospirillum brasiliense* Sp7 // Мол. генет., микробиол., вирусол. 1987. № 8. С. 16–18.
13. Alexandre G., Bally R. Emergence of a laccase-positive variant of *Azospirillum lipoferum* occurs via a two-step phenotypic switching process // FEMS Microbiol. Lett. 1999. V. 174. P. 371–378.
14. Alexandre G., Rohr R., Bally R. A phase variant of *Azospirillum lipoferum* lacks a polar flagellum and constitutively expresses mechanosensing lateral flagella // Appl. Environ. Microbiol. 1999. V. 65. N 10. P. 4701–4704.
15. Шелудько А.В., Кацы Е.И. Образование на клетке *Azospirillum brasiliense* полярного пучка пилей и поведение бактерий в полужидком агаре // Микробиология. 2001. Т. 70. № 5. С. 662–667.
16. Матора Л.Ю., Серебренникова О.Б., Петрова Л.П., Бурыгин Г.Л., Щеголев С.Ю. Нетипичный характер R-S диссоциации *Azospirillum brasiliense* // Микробиология. 2003. Т. 72. № 1. С. 60–63.
17. Vial L., Lavire C., Mavingui P., Blaha D., Haurat J., Moënné-Loccoz Y., Bally R., Wisniewski-Dyé F. Phase variation and genomic architecture changes in *Azospirillum* // J. Bacteriol. 2006. V. 188. N 15. P. 5364–5373.
18. Ильинская О.Н., Колпаков А.И., Зеленин П.В., Круглова З.Д., Чойдаш Б., Дорошенко Е.В., Мулюкин А.Л., Эль-Регистан Г.И. Влияние аутоиндукторов анабиоза на геном микробных клеток // Микробиология. 2002. Т. 71. Вып. 2. С. 194–199.
19. Хабибуллин С.С., Николаев Ю.А., Лойко Н.Г., Голод Н.А., Милько Е.С., Войкова Т.А., Эль-Регистан Г.И. Ауторегуляция фенотипической диссоциации у *Bacillus licheniformis* // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2006. № 6. С. 9–13.
20. Setlow P. Mechanisms for the prevention of damage to the DNA in spores of *Bacillus* species // Annu. Rev. Microbiol. 1995. V. 49. P. 29–54.
21. Frenkel-Krispin D., Levin-Zaidman S., Shimoni E., Wolf S.A., Wachtel E.T., Arad T., Finkel S.E., Kolter R., Minsky A. Regulated phase transitions of bacterial chromatin: a non-enzymatic pathway for generic DNA protection // The EMBO J. 2001. V. 20. P. 1184–1191.
22. Давыдова О.К., Дерябин Д.Г., Никиян А.Н., Эль-Регистан Г.И. О механизмах взаимодействия ДНК с химическими аналогами микробных аутоиндукторов анабиоза // Микробиология. 2005. Т. 74. № 5. С. 616–625.
23. Сузина Н.Е., Мулюкин А.Л., Козлова А.Н., Шорхова А.П., Дмитриев В.В., Баринова Е.С., Мохова О.Н., Эль-Регистан Г.И., Дуда В.И. Тонкое строение покоящихся клеток некоторых неспорообразующих бактерий // Микробиология. 2004. Т. 73. № 4. С. 516–529.
24. Soina V. S., Mulyukin A. L., Demkina E. V., Vorobyova E. A., El-Registan G. I. The structure of resting bacterial populations in soil and subsoil permafrost // Astrobiology. 2004. V. 4. 345–358.

25. Волкогон В.В., Мамчур А.Е., Лемешко С.В., Мицайло В.Г. Азоспириллы – эндофиты семян злаковых растений // Микробиол. журн. 1995. Т. 57. № 1. С. 14–19.
26. Антонюк Л.П., Камнев А.А., Чернышев А.В., Игнатов В.В. Образование кристаллов струвита при культивировании почвенной бактерии *Azospirillum brasiliense* // Докл. РАН. 1996. Т. 350. № 3. С. 421–423.
27. Kamnev A.A., Antonyuk, L.P., Colina M, Chernyshev A.V., Ignatov V.V. Investigation of a microbially produced structural modification of magnesium-ammonium orthophosphate // Monatshefte für Chemie. 1999. V. 130. № 12. P. 1431–1442.
28. van der Woude M. W., Baumler A. J. Phase and antigenic variation in bacteria // Clin. Microbiol. Rev. 2004. V. 17. P. 581–611.
29. Шелудько А.В., Кулибякина О.В., Широков А.А., Петровая Л.П., Матора Л.Ю., Кацы Е.И. Влияние мутаций в синтезе липополисахаридов и полисахаридов, связывающих калькофлуор, на формирование биопленок *Azospirillum brasiliense* // Микробиология. 2008. Т. 77. № 3. С. 358–363.