

УДК 57.579.2

МОРФОЛОГО-КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ НОВЫХ ШТАММОВ *AZOSPIRILLUM FORMOSENSE*

Гусейнова С. Р.¹, Решетник Г. В.¹, Сидякин А. И.^{1,2}

¹*Таврическая академия (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского», Симферополь, Республика Крым, Россия*

²*«Научно-производственное объединение Биотехсоюз», Москва, Россия.
E-mail: guseinovasaide97@mail.ru*

В статье представлены результаты исследований, связанные с изучением морфолого-культуральных, биохимических и ферментативных особенностей новых штаммов *Azospirillum formosense*. Проведенные исследования показали, что размер и пигментация колоний варьирует в зависимости от среды. Изучены и описаны ростовые особенности штаммов на средах МПА, BMS, Caseres. Штаммы являются амилазо- и липазо-, уреазо-положительными, однако протеазо-отрицательными.

Ключевые слова: *Azospirillum formosense*, diaзотроф, ассоциативные азотфиксаторы, ростстимулирующие бактерии, олигонитрофильность.

ВВЕДЕНИЕ

Повышение урожайности сельскохозяйственных культур в значительной степени зависит от обеспеченности элементами минерального питания, одним из которых наиболее необходимым является – азот. Источником экологически чистого биологического азота в почве являются микроорганизмы, способные фиксировать молекулярный азот. К таким микроорганизмам относятся ассоциативные азотфиксаторы [1, 2].

Ассоциативные микроорганизмы рода *Azospirillum* занимают особое положение в ряду почвенных азотфиксаторов. Бактерии рода *Azospirillum* в ризосфере зерновых культур формируют высокоэффективные микроассоциации, оказывающие положительное влияние на рост и развитие (PGPR – Plant Growth-Promoting Rhizobacteria), благодаря своей способности к фиксации атмосферного азота, продукции фитогормонов, контролю фитопатогенов [3, 4]. Однако разнообразие азоспирилл, применяемых в агробиотехнологии невелико и ограничивается модельными и близкими к ним по генетическим и антигенным характеристикам штаммами [3]. В связи с этим поиск ростстимулирующих штаммов рода *Azospirillum* является актуальной задачей сельскохозяйственной биотехнологии и промышленной микробиологии [5–7].

Целью работы является изучение физиологических особенностей роста и ферментативной активности штаммов *Azospirillum formosense*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объектов исследования использовались штаммы *Azospirillum formosense* (S3 851; S4 850; S6 8494; S7 851; S 842(1), полученных из ризопланы дикорастущих злаков флоры Республики Крым [8].

В работе использовались стандартные микробиологические методы [9–11]. Для исследований морфологических особенностей колоний исследуемых штаммов применялись питательные среды: BMS, Saceres (RjC) [12], МПБ (мясо-пептонный бульон), рН до автоклавирования 7,0–7,2. При их описании учитывали следующие признаки: профиль, форма, размер, поверхность, блеск и прозрачность, цвет, край, структура и консистенция [11, 13].

Определение сахаролитической активности изучаемых штаммов азоспирилл проводили на среде Гисса. Штаммы *Azospirillum formosense* засеивали штрихом на скошенную поверхность питательной среды, культивировали при 30 °С в термостате. Рост или его отсутствие на среде с данным источником углерода определяли визуально, кислотообразование – по изменению цвета индикатора с зеленого на желтый вследствие образования кислоты или на синий – подщелачивание вследствие аммонификации пептона. Результаты наблюдений сравнивали с показателями роста в контрольной фоновой среде.

Для выявления амилолитической активности использовали среду содержащую растворимый крахмал. Исследуемые микроорганизмы высевали одним штрихом по диаметру чашку Петри. Гидролиз крахмала обнаруживали после обработки агаровой пластинки раствором Люголя. Среда, содержащая крахмал, окрашивается в синий цвет, а зона гидролиза остается бесцветной или приобретает красно-бурую окраску, если крахмал гидролизировался до декстринов.

Протеолитическая активность бактерий проявляется в катализе расщепления белков на поли- и олигопептиды. Активность внеклеточных протеаз определяли, используя в качестве субстрата желатин по методу, описанному в работе Герхардта [10].

Липолитическую активность исследуемых штаммов *Azospirillum formosense* высевали на среду, содержащую твин-80 – эфир олеиновой кислоты и сорбита. Штаммы высевали штрихом одной линией по диаметру чашки исследуемый штамм. На наличие липазы указывает образование вокруг штриха или колонии непрозрачной зоны кальциевых солей жирных кислот, освобожденных из твина-80 [10].

Обнаружение уреазы исследуемых штаммов *Azospirillum formosense* исследовали на агаре Кристенсена. Пробирки со средой скашивают и засеивают штрихом исследуемые штаммы. Об обнаружении уреазной активности штаммов *Azospirillum formosense* судят по изменению цвета питательной среды (появление красно-фиолетовой окраски) [10].

Олигонитрофильный рост штаммов *Azospirillum formosense* учитывают на элективной среде Эшби, посев проводят точно, продолжительность культивирования – 7–10 суток [9, 11] и учитывают интенсивность роста бактерий на среде.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что в зависимости от условий культивирования: состава питательной среды, температуры, наличия или отсутствия источников освещения морфология колоний микроорганизмов при росте на плотных питательных средах может в значительной степени варьировать.

согласно проведенным исследованиям было показано, что культуры всех штаммов культивируемых на BMS-среде образуют колонии светло-бирюзовые, непрозрачные, округлой формы, край колоний ровный, профиль выпуклый.

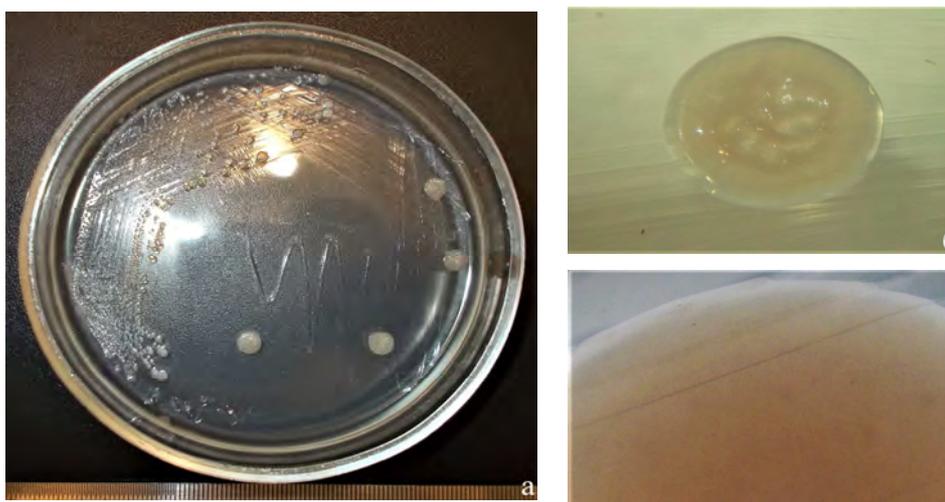


Рис. 1. Морфология колоний штамма *A. formosense* S7 851 при выращивании на МПА: а – общий вид колоний в чашке Петри; б, в – структура и край колоний под микроскопом (ув. $\times 40$).

Колонии штамма S842 (1) точечные. Штаммы S3 851, S6 849, S7 851 образуют колонии диаметром 1–2 мм, S 4 850 – 1–3 мм. Со временем диаметр колоний варьирует, они становятся морщинистыми и сухими, колонии приобретают светло-бирюзовый цвет.

На среде *RjC* начало роста для всех штаммов отмечалось на вторые сутки. Колонии приобретали красную окраску, четкой округлой формы с ровными краями и плоским профилем. Структура колоний имела пленчатую консистенцию, зернистая, обладая способностью к эмульгированию. На 5 сутки роста штаммов на питательной среде размер колоний увеличивался и пигментация становилась темно-красной окраски.

На мясо-пептонном агаре точечный рост колоний штаммов *Azospirillum formosense* отмечается на вторые сутки. Цвет колоний изменялся от молочного до светло – желтого, полупрозрачные с блестящей поверхностью, округлые (штамм S 6 849 имеет неправильную форму) выпуклым профилем, гладким краем и однородной

структурой и маслянистой консистенцией, зернистой способностью к эмульгированию, диаметр колоний составлял 4–5,5 мм (рис. 1).

Рост колоний на первые сутки наблюдается на среде BMS и МПА, интенсивность роста изучаемых штаммов проявляется на 2–4 сутки на всех средах, пигментация колоний зависит от среды культивирования.

Для выяснения роста микроорганизмов за счет тех или других углеродсодержащих компонентов высевали на питательные среды, содержащие в качестве единственного источника углерода моно-и дисахариды, многоатомные спирты. из многоатомных спиртов и углеводов мы испытывали следующие соединения: арабинозу, галактозу, рамнозу, глюкозу, фруктозу, маннитол, лактозу, мальтозу, глицерин.

Проведенные исследования показали, что все изучаемые штаммы *Azospirillum formosense* утилизируют фруктозу, мальтозу, рамнозу, галактозу, а также глицерин с образованием кислоты. К маннитолу не проявил активности штамм S 6 849 (сбраживание маннитола с образованием щелочи); к арабинозе – штаммы S 7 851 и S 3 851. Штамм S 3 851 не утилизирует лактозу (таблица).

Таблица

Утилизация углеводов штаммами *Azospirillum formosense*

Исследуемый углевод	3 сутки культивирования					5 сутки культивирования				
	Утилизация углеводов*									
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
глицерин	+	+	+	+	+					
арабиноза			–		–				–	
рамноза	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
фруктоза					+	+	+	+	+	
маннитол	–	–	–	–		–	–	–	–	–
галактоза	–	–	–		–	+	+	–	+	
глюкоза	+	+	–	+	+					
лактоза	–	–	–	–	–			–	–	–
мальтоза	–	–	–	–	–			–	–	

*Условные обозначения:

+	– положительная реакция (сбраживание с образованием кислоты);
–	– положительная реакция (сбраживание с образованием щелочи);
	– углевод не утилизируется

Обильный рост колоний штаммов *Azospirillum formosense* на без азотистой среде Эшби свидетельствует о принадлежности штаммов *Azospirillum formosense* к олигонитрофильным микроорганизмам, способным усваивать азот как из воздуха, так и из следовых количеств азота из реактивов питательных сред.

Изучая физиолого-биохимические особенности исследуемых штаммов *Azospirillum formosense* установлено, что амилолитическая активность характерна для всех штаммов и проявляется в гидролизе крахмала амилазами бактерий.

Согласно проведенным исследованиям изучаемые штаммы проявили разную степень активности: максимальная амилолитическая активность характерна для штамма S842 (1), тогда как наименьшая – у штамма S6 849 (рис. 2).



Рис. 2. Амилолитическая активность штамма *A. formosense* S4 850 (а – 24; б – 48; в – 72 часов при 30 °С).

Для всех изучаемых штаммов характерна липолитическая активность. При росте микроорганизмов на среде, содержащей твин-80 образовывали смутные зоны кальциевых солей жирных кислот (рис. 3).

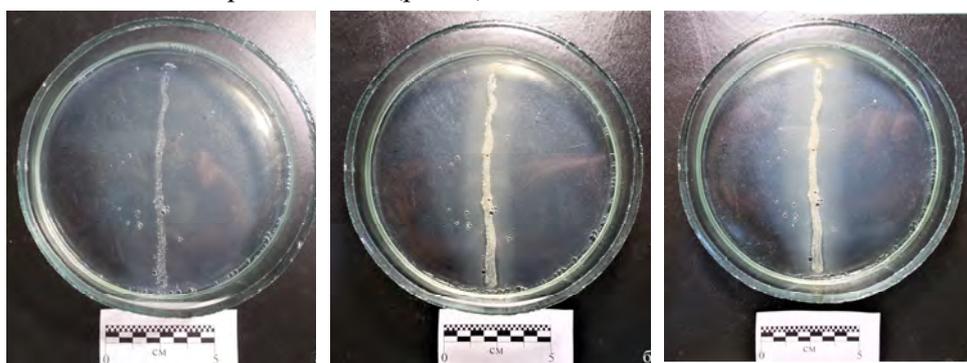


Рис. 3. Липолитическая активность штамма *A. formosense* S 842 (1) (а – 24; б – 48; в – 72 часов при 30 °С).

Ни один из штаммов не проявил протеолитическую активность, тогда как уреазную активность проявили все изучаемые штаммы *Azospirillum formosense*, о чем свидетельствовало изменение цвета среды Кристенсена с мочевиной с бесцветного на красно-фиолетовый цвет.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Штаммы *Azospirillum formosense* S3 851, S4 850, S6 849, S7 851, S 842 (1) на дифференциально-диагностических питательных средах BMS, RjC и МПА

образуют колонии с ровным краем и округлой формы, диаметр и пигментация варьирует в зависимости от среды.

- Исследование физиолого-биохимических свойств штаммов *Azospirillum formosense* показало, что наблюдается значительная вариативность по признакам утилизации углеводов: штамм S 3 851 не утилизирует арабинозу и лактозу, штамм S 7 851 – арабинозу, штамм S 6 849 не сбраживает маннитол. По использованию источников азотного питания все изучаемые штаммы *Azospirillum formosense* – олигонитрофиллы.
- Определение ферментативной активности показало, что исследуемые штаммы *Azospirillum formosense* обладают амилолитической, липолитической и уреазной активностью, протеолитическая активность не выявлена.

Список литературы

- Берестецкий О.А. Азотфиксирующая активность и эффективность спирилл, обитающих на корнях растений / О.А. Берестецкий [и др.] // Микробиология. – 1985. – Т. 54, Вып. 6. – С. 1102–1007.
- Берестецкий О.А. Азотфиксирующая активность в ризосфере и на корнях небобовых растений / О. А. Берестецкий, Л. Ф. Васюк // Изв. АН СССР, серия биол. – 1983. – № 1. – С. 44–50.
- Jain D.K. Root hair deformation, bacterial attachment and plant growth in wheat–*Azospirillum* association / D.K. Jain, D.G. Patriquin // Appl. Environ. Microbiol. – 1984. – V. 48. – P. 1208–1213.
- Tyler M.E. Isolation of *Azospirillum* from diverse geographic regions / M. E. Tyler, J.R. Milam, R. L. Smith, S. C. Schank, D. A. Zuberer // Can. J. Microbiol. – 1979. – V. 25 – P. 4673–4680.
- Воробейков Г.А. Микроорганизмы в агробиотехнологиях и защите природной среды: учебное пособие / Г. А. Воробейков, В. Н. Бредихин. – СПб.: Изд-во РГПУ им. А. И. Герцена, 2018. – 219 с.
- Егоров Н. С. Промышленная микробиология : учеб. пособие / Под ред. Н. С. Егорова. – М.: Высшая школа, 1989. – С. 602–606.
- Моргун В. В. Ростостимулирующие ризобактерии и их практическое применение / В. В. Моргун, С. Я. Коць, Е. В. Кириченко // Физиология и биохимия культурных растений. – 2009. – Т.41, № 3. – С. 187–207.
- Гусейнова С.Р. Изучение морфолого-культуральных свойств и биологической эффективности новых штаммов *Azospirillum formosense* / С.Р. Гусейнова, А. И. Сидякин, Г. В. Решетник, И. В. Булавин // Экспериментальная биология растений: фундаментальные и прикладные аспекты: ОФР, науч.конф.и школа для мол.уч.18-24 сент. 2017 г., Судак: сб. мат. докл./ Отв. ред. Вл. В. Кузнецов М: Изд-во АНО «Центр содействия научной, образовательной и просветительской деятельности «Соцветие», 2017. – 393 с.
- Теппер Е.З. Практикум по микробиологии / Е.З. Теппер, В. К. Шильникова, Г. И. Переверзева // Москва: Колос, 1993. – 175 с.
- Герхардт Ф. Методы общей бактериологии: в 3 т. Т. 3. Пер. с англ. / Под ред. Ф. Герхардта [и др.] – М.: Мир, 1984. – 264 с.
- Егоров Н.С. Руководство к практическим занятиям по микробиологии : учеб. пособие / Под ред. Н. С. Егорова. – 3-е изд., перераб. и доп. – М. : изд. МГУ, 1995. – 224 с.
- Saceres E.A.R. Improved medium for isolation of *Azospirillum spp.* / Saceres E.A.R. // Applied and Environmental Microbiology. – 1982. – 44 (4) – P. 990–991.
- Определитель бактерий Берджи: В 2 т.– Т. 1.– Пер. с англ. / Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейли, С. Уильямса. – М.: Мир, 1997. – 432 с.

MORPHOLOGICAL AND CULTURAL AND PHYSIOLOGICAL FEATURES OF
NEW *AZOSPIRILLUM FORMOSENSE* STRAINS

Guseynova S. R.¹, Reshetnik G. V.¹, Sidyakin A. I.^{1,2}

¹V. I. Vernadsky Crimean Federal University», Simferopol, Crimea, Russia

²Research and production association Biotechsoyuz, Moscow, Russian Federation

E-mail: guseinovasaide97@mail.ru

The article presents the results of the research, related to the study of morphological, cultural, biochemical, and enzymatic features of new strains of *Azospirillum formosense*. *Azospirillum formosense* strains (S3 851; S4 850; S6 8494; S7 851; S 842 (1), obtained from the rhizoplanes of the wild-growing flora of the Republic of Crimea were used as objects of the study. For the studies of the morphological features of the colonies, nutrient media were used: *BMS*, *Caceres (RjC)*, *MPA* (meat-peptone agar); pH before autoclaving was 7.0–7.2. When cultured on *BMS* medium, colonies of light turquoise, opaque colour, round shape are formed, the edge of the colonies is even, the profile is convex, the size of the colonies varies from 3.5 to 5 mm; as for the *RjC* medium, colonies are formed of red color, dotted, rounded, with a smooth edge and a flat profile, homogeneous structure, granular emulsifying ability and a membranous consistency, with the growth of strains the colony increased in size to 2.5 mm, acquiring a dark red color; on meat-peptone agar, the color of the colonies changed from milky to light yellow, translucent with a shiny surface, rounded, with a convex profile, smooth edge, uniform structure and oily consistency, granular emulsifying ability; diameter of colonies – 4–5.5 mm. For the study of physiological and biochemical features, Hiss medium was used. It was established that all *Azospirillum formosense* strains utilize fructose, maltose, rhamnose, galactose, and also glycerol with the formation of acid (strain S6 849 did not show activity to mannitol, strains S7 851 and S3 851– to arabinose; S3 851 strain did not utilize lactose). In the study of enzymatic activity and oligonitrophilicity, the following media were used: Christensen agar, Ashby, medium containing tween-80 and starch. It was found that amylolytic activity was characteristic of all strains and was manifested in the hydrolysis of starch by bacterial amylases (the maximum amylolytic activity was characteristic of strain S842 (1), while the smallest – in strain S6 849), they also have lipolytic and urease activity, but did not show proteolytic activity. Abundant growth of colonies of *Azospirillum formosense* strains on the Ashby nitrogen-free medium indicates that the strains belong to oligonitrophilic microorganisms.

Keywords: *Azospirillum formosense*, diazotrophic, associative nitrogen-fixing agents, growth-stimulating bacteria, oligonitrophilicity.

References

1. Berestetsky O.A., Nitrogen-fixing activity and effectiveness of spirill living on plant roots, *Microbiology*, **54** (6), 1102 (1985).
2. Berestetsky O.A., Vasiuk L.F., Nitrogen-fixing activity in the rhizosphere and on the roots of non-basic plants, *Bulletin of Academy of Sciences of the USSR, series biol.*, **1**, 44 (1983).

3. Jain D.K., Patriquin D.G., Root hair deformation, bacterial attachment and and plant growth in wheat–*Azospirillum* association, *Appl. Environ. Microbiol*, **48**, 1208 (1984).
4. Tyler M.E., Milam J.R., Smith R.L., Schank S.C., Zuberer D.A., Isolation of *Azospirillum* from diverse geographic regions, *Can. J. Microbiol*, **25**, 4673 (1979).
5. Vorobeykov, G.A., Bredikhin V.N., *Microorganisms in agrobiotechnologies and environmental protection: a tutorial*, 219 p. (Publishing House of the Russian State Pedagogical University named after A. I. Herzen, St. Petersburg, 2018).
6. Egorov N.S., *Industrial microbiology: textbook*, 602 (Vysshaya Shkola Publishing House, Moscow, 1989).
7. Morgun V.V., Kots S.Ya., Kirichenko E.V., Growth-promoting rhizobacteria and their practical application, *Physiology and Biochemistry of Cultivated Plants*, **41** (3), 187 (2009).
8. Huseynova S.R., Sidyakin A.I., Reshetnik G.V., Bulavin I.V., Study of morphological and cultural properties and biological effectiveness of new strains of *Azospirillum formosense*, *Abstracts of Experimental Plant Biology: Fundamental and Applied Aspects: Society of Plant Physiologists Science Conference and School for young scientists in Sudak, September 18–24, 2017*, edited by Kuznetsov V.L. (Publishing house ANO “Center for the promotion of scientific, educational and outreach activities “Sotsvetie”, Moscow, 2017), 393 p.
9. Tepper E.Z., Shilnikova V.K., Pereverzeva G.I., *Workshop on Microbiology*, 175 p. (Kolos Publishing House, Moscow, 1993).
10. Gerhardt P., *Manual of methods for general bacteriology*, **3**, 264 p. (Mir Publishing House, Moscow, 1984).
11. Egorov N.S., *Guide to practical classes in microbiology: a tutorial*, 224 p. (Moscow State University, Moscow, 1995).
12. Caceres E.A. R. Improved medium for isolation of *Azospirillum spp.*, *Applied and Environmental Microbiology*, **44** (4), 990 (1982).
13. Hout J., Krieg N., Snita P., Staley J., Williams S., *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 2 vol. 432 p. (Mir Publishing House, Moscow, 1997).