иммунитет, равно и расширения сортимента культуры в условиях Краснодарского края. Семена образцов хранятся в Генетическом банке ВИР.

1. Генетические ресурсы *Lactuca sativa* ВИР: репродукция 2017г. – URL: https://www.facebook.com/nina.grinko/photos_albums#
2. Гибридизация изолятов гриба *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucum* URL: https://www.facebook.com/nina.grinko/photos_albums#.
3. Гринько Н.Н., Туренко В.П. Полиморфизм образцов салата из коллекции ВИР по признаку устойчивости к фузариозу// Корневые гнили сельскохозяйственных культур: биология, вредоносность, системы защиты: Матер. межд. науч. - практ. конф. Краснодар, 14–17 апреля 2014 г. /отв. ред. М.И.Зазимко. – Краснодар: КубГАУ, 2014. – С. 15 – 18.
4. Культурная флора СССР: Листовые овощные растения // Под общ. рук-вом акад. ВАСХНИЛ В.Ф.Дорофеева. – Л.: Агропромиздат, 1988.– Т. XII. – 304с.
5. Национальное достояние России – генофонд рода *Lactuca* L. ВИР – URL: https://www.facebook.com/nina.grinko/photos_albums#
6. Полиморфизм гриба *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucum* – URL: https://www.facebook.com/nina.grinko/photos_albums#.
7. Репродукция геноресурсов *Lactuca sativa* L. ВИР_2018 – URL: https://www.facebook.com/nina.grinko/photos_albums#
8. Hubbard J.C., Gerik J.S. A new wilt disease of lettuce incited by *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucum* forma specialis nov.// Plant Disease, 1993. – V. 77, № 7. – С. 750–754.
9. Garibaldi A., Gilardi G., Berta F., and Gullino M. L. Temperature and leaf wetness affect the severity of leaf spot on lettuce and wild rocket incited by *Fusarium equiseti*// Phytoparasitica, 2016. – V. 44, № 5. – P. 681–687.
10. Gilardi G., Franco P.S., van Rijswijk P.C.J., Ortu G., Gullino M. L., and Garibaldi A. A new race of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucae* of lettuce// Plant Pathology, 2017. – V. 66, № 4. – P. 677–688.

Хуснетдинова К.А., Тихонова Е.Н.

Азоспириллы северных болот: особенности метаболизма и стратегии выживания

Федеральное государственное учреждение *Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук*
(Россия, Москва)

doi: 10.18411/sr-10-02-2019-56

idsp: sciencerussia-10-02-2019-56

Аннотация

Из образцов торфа, отобранных из болот Тверской и Московской областей (Россия), выделены 4 штамма бактерий, относящихся к роду *Azospirillum*. Экспериментально показана способность новых изолятов к использованию метанола в качестве единственного источника углерода и энергии. В работе рассматривается возможная стратегия выживания бактерий рода *Azospirillum* в нехарактерных для них условиях кислых олиготрофных болот в отсутствие высших сосудистых растений.

Ключевые слова: *Azospirillum*, болотные экосистемы, метилотрофия, микробные ассоциации.

Abstract

Four bacterial strains belonging to the genus *Azospirillum* were isolated from raised peatlands of the Tver and Moscow regions (Russia). For them, the ability to use methanol as the sole source of carbon and energy has been experimentally shown. The paper discusses a possible survival strategy for bacteria of the genus *Azospirillum* in unusual for them conditions of acid oligotrophic bogs in the absence of higher vascular plants.

Keywords: *Azospirillum*, methylophily, raised bog, microbial associations.

Бактерии рода *Azospirillum* (азоспириллы), входят в семейство *Rhodospirillaceae* класса *Alphaproteobacteria* и являются экологически значимыми и агрономически ценными ризобактериями дикорастущих и сельскохозяйственных растений. Изначально азоспириллы считались специфичными представителями почв тропического и субтропического регионов [Dobereiner 1976; Tyler 1979], однако позднее было установлено их широкое распространение в зонах умеренного [Vlassak 1981] и даже субарктического климата [Lindberg 1984].

Азоспириллы наряду с псевдомонадами и бациллами, относятся к наиболее исследуемым ростстимулирующим ризобактериям [Somers et al., 2004]. Постоянный интерес исследователей к представителям рода *Azospirillum* на протяжении нескольких десятилетий обусловлен тем, что, являясь азотфиксаторами и денитрификаторами, а также продуцентами биологически активных веществ, эти бактерии вступают в тесные отношения с агрономически значимыми растениями. Прикрепляясь к корням и колонизируя ткани растений, азоспириллы способствуют улучшению роста, повышению урожайности и резистентности к патогенам, что обуславливают перспективность их использования в качестве активного агента бактериальных удобрений. Кроме того, *Azospirillum* отличаются пластичным метаболизмом углерода и азота, что в значительной мере способствует их адаптации, приживаемости и жизнедеятельности в конкурентных условиях ризосферы.

Несмотря на многочисленные экологические исследования, крайне ограничена информации о существовании *Azospirillum* вне ризосферы и филлосферы высших растений, однако в последние годы появились данные о выделении азоспирилл из нетипичных для них местобитаний. Так, *A. rugosum* [Young et al., 2008] и *A. picis* [Lin et al., 2009] были выделены из загрязненной нефтью почвы и выброшенной дорожной смолы. *A. thiophilum* была выделена из серного источника (Ставропольский край, Северный Кавказ, Россия) и продемонстрировала способность к литогетеротрофному росту в микроаэрофильных условиях с одновременным использованием органических субстратов и тиосульфата в качестве донора электронов для энергетического обмена [Lavrinenko et al., 2010]. *A. humicireducens* [Zhou et al., 2013] была изолирована с поверхности электрода микробного топливного элемента.

В ходе молекулярных исследований состава микробных сообществ верховых олиготрофных болот Европейской части России с помощью анализа генов 16s rРНК и *nifH* были получены данные о присутствии в них бактерий, филогенетически близких к бактериям рода *Azospirillum* [Дорошенко и др., 2007]. Нами была высказана гипотеза, что метаболическая пластичность азоспирилл позволяет им выживать в необычных условиях кислых болот. Одним из способов такого приспособления может быть использование одноуглеродных соединений, в первую очередь метанола, который может образовываться как промежуточный продукт микробного окисления метана в условиях недостатка кислорода, а также за счет разложения пектиновых веществ. В качестве популяционного механизма реализации этой возможности рассматривается образование ассоциаций с метанотрофными бактериями. Основанием для гипотезы послужил тот факт, что метилотрофный штамм *Azospirillum* sp. В2 был получен из стабильной накопительной метанотрофной культуры из почвы олиготрофного болота [Дорошенко и др., 2007].

Целью настоящей работы было изучение изолятов метилотрофных азоспирилл, полученных нами из болотных экосистем Европейской части России и

экспериментальная оценка возможности образования ими эффективных ассоциаций с метанотрофными бактериями.

Материалы и методы

Выделение и культивирование новых штаммов бактерий рода *Azospirillum* проводили с использованием полужидкой безазотной среды NFb с малатом натрия [Eckert et al., 2001]. Для оценки метилотрофного роста малат натрия заменяли на метанол или формиат (0.5 г/л). Культивирование проводили в течение 14 суток при 25°C.

В эксперименте по образованию ассоциаций с метанотрофными бактериями культивирование проводили на среде "П" [Гальченко 2001]. Бинарная культура, состояла из *Methylocystis minimus* 26 и *Azospirillum* sp. B2 в соотношении 3:1. В качестве единственного источника углерода и энергии использовали метан (метан: воздух=1:1). Инкубирование проводили в течение 14 суток при 29°C при постоянном перемешивании. Рост контролировали по величине оптической плотности суспензии (OD₆₀₀).

Идентификацию культур азоспирилл проводили методом секвенирования гена 16s рРНК. Для детекции *mxaF*, гена, кодирующего синтез альфа-субъединицы метанодегидрогеназы, ключевого фермента окисления метанола, использовали праймерную систему F1003 и R1561 и условия ПЦР в соответствии с условиями, описанными в публикации [Lau et al., 2013].

Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей осуществляли онлайн-инструментом BLAST [Altschul et al., 1990] и сравнивали с нуклеотидными последовательностями 16s рРНК из базы данных GenBank. Филогенетическая дендрограмма, была получена с помощью метода neighbor-joining, реализованного в программном пакете MEGA4.

Рис.1 Филогенетическое древо, основанное на последовательностях генов 16S рРНК, сконструированных по методу neighbour-joining, иллюстрирующее связь между вновь выделенными штаммами *Azospirillum* sp. и ближайшими родственниками рода *Azospirillum*.

Оценка численности бактерий методом FISH (fluorescent in situ hybridization). Для детекции клеток метанотрофов II типа использовали рРНК-олигонуклеотидный зонд (Синтол, Россия), меченный флуоресцентным красителем Cy3 M-450 (5'-3'): АТС CAG GTA CCG TCA TTA ТС. Гибридизацию проводили по общепринятым методам [Amann et al., 1990], препараты докрашивали раствором ДАФИ для оценки общего количества бактерий и анализировали с использованием люминесцентного микроскопа AxioImager D1 (Carl Zeiss, Германия).

Результаты и обсуждение

Штаммы *Azospirillum* sp. B2, B21, B22 были выделены из почв кислых верховых сфагновых болот Тверской области как компоненты накопительных метанооксиляющих культур [Дорошенко и др. 2007]. В 2018 году из образца торфа осушенного болота Московской области нами был выделен штамм Sh 1, относящийся к роду *Azospirillum*. Филогенетический анализ (Рис.1) показал, что три культуры B21, B22 и Sh 1 образуют компактный кластер и ближайшими валидно описанными культурами для них являются *A. oryzae* COC8^T и *A. zeae* N7. В то же время штамм B2 формировал отдельную ветвь на филогенетическом древе и наибольшая степень сходства была выявлена с *A. humicireducens* SgZ-5^T (Рис.1).

Экспериментальная проверка показала, что все четыре штамма использовали метанол и формиат в качестве единственного источника углерода.

С помощью ПЦР-анализа нам не удалось детектировать наличие *mxaF*, гена-маркера окисления метанола, кодирующего синтез метанолдегидротгеназы, ни для одного из болотных изолятов азоспирилл. Для выяснения путей метаболизма метанола было проведено секвенирование генома штамма B2, в результате которого *mxaF* не был детектирован, но был найден гомолог метанолдегидротгеназы – ген *хохF* [Grouzdev et al. 2018]. Ранее присутствие только *хохF* гена было показано лишь для метилотрофных представителей *Verrucomicrobia*.

Болота являются одним из важнейших естественных источников метана, окисление которого осуществляют метанотрофные бактерии, составляющие значительную часть микробного сообщества в болотных экосистемах. Интермедиатом окисления метана является метанол, который, согласно нашей гипотезе, используют азоспириллы, образующие ассоциации с метанотрофными бактериями. Для проверки нами была составлена и изучена искусственная бинарная культура, состоящая из *Methylocystis minimus* 26 и *Azospirillum* sp. B2. в соотношении 3:1. Результаты эксперимента приведены в Таблице 1.

Таблица 1.

Количественные характеристики роста бинарной культуры и ее компонентов на среде с метаном в качестве единственного источника углерода и энергии. Приведены усредненные данные 3-х повторностей эксперимента

Вариант опыта	Общее количество клеток в мл (окраска DAPI)		Количество клеток МТ в мл Зонд М 450		Количество клеток AZ в мл		Состав сообщества, соотношение МТ:AZ	
	0 сут	14 сут	0 сут	14 сут	0 сут	14 сут	0 сут	14 сут
Метанотроф (МТ)	0,53×10 ⁵	1,12×10 ⁶	0,53×10 ⁵	1,12×10 ⁶	0	0	1:0	1:0
Азоспирилла (AZ)	2,04×10 ⁵	1,6×10 ⁵	0	0	2,04×10 ⁵	1,6×10 ⁵	0:1	0:1
Бинарная культура	1,53×10 ⁵	4,6×10 ⁶	1,11×10 ⁵	3,5×10 ⁶	0,42×10 ⁵	1,1×10 ⁶	3:1	3:1

Из данных таблицы следует, что в отсутствие метанотрофов увеличение численности азоспирилл на среде с метаном не происходило. В то же время, в бинарной культуре оба компонента давали прирост численности клеток, и для азоспириллы он составил более 20 раз за 14 сут. При этом соотношение МТ:АЗ оставалось неизменным.

Таким образом, установлено, что распространение бактерий рода *Azospirillum* гораздо шире, чем было известно ранее. Экологический механизм выживания азоспирилл в водонасыщенных местообитаниях с высоким уровнем образования метана может реализоваться в форме образования ассоциаций с метанооксиляющими организмами и использования метанола в качестве источника углерода.

Гипотеза получила экспериментальное подтверждение в настоящей работе - рост азоспирилл может осуществляться за счет использования метанола, которое контролируется для штамма В2 геном *хохF*. Детальное изучение метаболизма и генетических характеристик группы метилотрофных азоспирилл В21, В22 и Sh1 составят предмет наших дальнейших исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта мол_а № 18-34-00390.

1. Altschul S, Gish W, Miller W, Myers E, Lipman D. Basic local alignment search tool. J Mol Biol 1990. 215: 403–410.
2. Amann RI, Krumholz L, Stahl DA. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. J Bacteriol 1990. 172(2): 762–770.
3. Dobereiner J. Associative symbioses in tropical grasses: Characterization of microorganisms and dinitrogen fixing sites. J. Dobereiner, J.M. Day. Nitrogen Fixation: proc. 1st Int. Symp. Eds. W.E. Newton and C.J. Nyman; Washington State Univ. Press. Pullman. Washington. USA. 1976. 518–538.
4. Eckert B, Weber OB, Kirchhof G, Halbritter A, Stoffels M et al. *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-grass *Miscanthus*. Int J Syst Evol Microbiol 2001. 51: 17–26.
5. Grouzdev DS, Tikhonova EN, Krutkina MS, Kravchenko IK. Genome sequence of methylotrophic *Azospirillum* sp. strain B2, isolated from a raised Sphagnum bog. Genome Announc 2018. 6(23): e00492–18.
6. Lau E, Fisher MC, Steudler PA, Cavanaugh CM. The methanol dehydrogenase gene, *mxhF*, as a functional and phylogenetic marker for proteobacterial methanotrophs in natural environments. PLoS ONE 2013. 8(2): e56993.
7. Lavrinenko K, Chernousova E, Gridneva E, Dubinina G, Akimov V et al. *Azospirillum thiophilum* sp. nov., a diazotrophic bacterium isolated from a sulfide spring. Int J Syst Evol Microbiol 2010. 60:2832–2837.
8. Lin SY, Young CC, Hupfer H, Siering C, Arun AB et al. *Azospirillum picis* sp. nov., isolated from discarded tar. Int J Syst Evol Microbiol 2009. 59: 761–765.
9. Somers E, Vanderleyden J, Srinivasan M. Rhizosphere bacterial signalling: a love parade beneath our feet. Crit Rev Microbiol 2004. 30(4): 205–224.
10. Tyler ME. Isolation of *Azospirillum* from diverse geographic regions. Can J Microbiol 1979. 25(6): 639–697.
11. Vlassak K. Agronomic aspects of biological dinitrogen fixation by *Azospirillum* spp in temperate zone. Associative N₂-fixation 1981. 1: 93–101.
12. Young CC, Hupfer H, Siering C, Ho MJ, Arun AB et al. *Azospirillum rugosum* sp. nov., isolated from oil-contaminated soil. Int J Syst Evol Microbiol 2008. 58: 959–963.
13. Zhou S, Han L, Wang Y, Yang G, Zhuang L et al. *Azospirillum humicireducens* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from a microbial fuel cell. Int J Syst Evol Microbiol 2013. 63: 2618–2624.
14. Гальченко В.Ф. Метанотрофные бактерии. Москва. ГЕОС. 2001.
15. Дорошенко ЕВ, Булыгина ЕС, Спиридонова ЕМ, Турова ТП, Кравченко ИК. Выделение и характеристика азотфиксирующих бактерий рода *Azospirillum* из почвы сфагнового болота. Микробиология 2007. 76(1): 107–115.