Biofilms of *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum* and their resistance to abiotic stresses

Yevstigneyeva S.S., Fedonenko Yu.P., Shelud'ko A.V.

Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms RAS, Saratov, Russia

E-mail: Stels20295@yandex.ru

Key message. The biofilms of the bacteria *A. brasilense* and *A. lipoferum* are resistant to salt (over 400 mM NaCl in the medium) and temperature (up to 48° C) stresses. The nature of resistance to these stressors is determined by the type of biofilm.

Keywords: bacteria of the genus *Azospirillum*, biofilms, abiotic stress

The biofilm formation of rhizobacteria *Azospirillum* on the root surface is a key step in the colonization of plants and the establishment with them of mutually beneficial relationships. Cells in microbial communities not only populate plant roots more efficiently, but are also more resistant to various environmental factors. The aim of the work was to estimate the stability of the *Azospirillum* biofilms formed on various surfaces under the influence of salt and temperature stresses. Strains *A. brasilense* Sp7, Sp245, and *A. lipoferum* Sp59b were cultivated under standard conditions (selective synthetic medium, 2 mM NaCl, 30°C) and under salt (selective synthetic medium, 250-500 mM NaCl, 30°C) and temperature (selective synthetic medium, 2 mM NaCl, 40-50°C) stresses for 5 days without shaking at the air-liquid and liquid-solid hydrophilic / hydrophobic surface interfaces. The thickness of the biofilms was determined using light phase contrast microscopy [1]. To evaluate the relative amount of biofilm biomass, bacteria were stained by crystal violet dye [2]. It was shown that strains Sp7 and Sp59b are more resistant to salt stress within biofilms in the air-liquid phase separation in comparison to other biofilm types and withstand concentrations above 400 mM NaCl in the medium. In the case of temperature stress, the highest resistance of these strains (48°C) was revealed for biofilm communities in the liquid-solid hydrophilic surface. Endophytic bacteria *A. brasilense* Sp245 in biofilms showed similar results under both salt and temperature stresses: pronounced resistance to 350 mM NaCl in the medium and 46°C was observed for biofilms formed at the air-liquid interface. It is likely that differences in the strategy of colonization of the plant roots determine the dominant type of *Azospirillum* biofilm formation, which allows it to resist the damaging environmental factors with maximum productivity and to increase competitiveness in the formation of plant-microbial associations.

Биопленки бактерий *Azospirillum brasilense* и *Azospirillum lipoferum* и их устойчивость к абиотическим стрессам

Евстигнеева С.С., Федоненко Ю.П., Шелудько А.В.

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, Россия

Аннотация. Биопленки бактерии *A. brasilense* и *A. lipoferum* являются устойчивыми к солевому (свыше 400 mM NaCl в среде) и температурному (до 48°C) стрессам. Характер резистентности к данным стрессорам определяется типом формируемой биопленки.

Ключевые слова: бактерии рода *Azospirillum*, биопленки, абиотический стресс

Формирование биопленок ризобактерий р. *Azospirillum* на поверхности корней является ключевым этапом колонизации растений и образования с ними взаимовыгодных ассоциаций. Клетки в составе микробных сообществ не только эффективнее заселяют корни растений, но и становятся более устойчивыми к различным факторам окружающей среды. Цель работы состояла в оценке устойчивости биопленок бактерий *Azospirillum*, сформированных на различных поверхностях, под воздействием солевого и температурного стрессов. Штаммы *A. brasilense* Sp7, Sp245 и *A. lipoferum* Sp59b культивировали без перемешивания в течение 5 суток для получения биопленок на поверхности раздела фаз «воздух-жидкость» и «жидкость-твердая гидрофильная/гидрофобная поверхность» в стандартных условиях (селективная синтетическая среда, 2 mM NaCl, 30°C) и при солевом (селективная синтетическая среда, 250-500 mM NaCl, 30°C) и температурном (селективная синтетическая среда, 2 mM NaCl, 40-50°C) стрессах. Толщину биопленок устанавливали с помощью световой фазово-контрастной микроскопии [1]. Для оценки относительного количества биомассы в биопленках бактерии окрашивали красителем кристаллическим фиолетовым [2]. Показано, что штаммы Sp7 и Sp59b являются более устойчивыми к солевому стрессу в составе биопленок на разделе фаз «воздух-жидкость» по сравнению с другими типами биопленок и выдерживают концентрации свыше 400 mM NaCl в среде. В случае температурного стресса наибольшая резистентность данных штаммов (48°C) была выявлена для биопленочных сообществ на разделе фаз «жидкость-твердая гидрофильная поверхность». Эндифитные бактерии *A. brasilense* Sp245 в составе биопленок проявляли сходные результаты как при солевом, так и при температурном стрессах: выраженная устойчивость по отношению к 350 mM NaCl в среде и 46°C наблюдалась для биопленок, сформированных на границе «воздух-жидкость». Вероятно, различия в стратегии колонизации корней растений определяют доминирующий тип биопленкообразования у азоспирилл, который позволяет максимально продуктивно противостоять повреждающим факторам среды и, в тоже время, увеличивать конкурентоспособность при формировании растительно-микробных ассоциаций.

1. Шелудько с соавт. (2015). *Микробиология*. 84 (2): 175–183.
2. O'Toole and Kolter. (1998). *Mol. Microbiol.* 28 (3): 449–461.