

УДК 579.233/234; 577.114.083

DOI: 10.31040/2222-8349-2019-0-1-77-82

**ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ПОЛУЧЕНИЯ ФЛОКУЛИРУЮЩИХ КУЛЬТУР
БАКТЕРИЙ *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* Sp7 И Sp245
И МОНОСАХАРИДНЫЙ СОСТАВ ИХ ГЛИКОПОЛИМЕРОВ**

© С.С. Евстигнеева, Д.А. Рыбальченко, Е.Н. Сигида, Ю.П. Федоненко, С.А. Коннова

Проведен скрининг флокулообразующей способности ассоциативных азотфиксирующих ризобактерий *Azospirillum brasilense* Sp7 и Sp245 при изменении продолжительности культивирования и состава среды. Выделены экзополисахариды (ЭПС), капсульные полисахариды (КПС), а также липополисахариды (ЛПС) внешних мембран флокулирующих культур и охарактеризован их моносакхаридный состав. При оптимизации условий флокулообразования использовали среды с дефицитом азота (соотношение C/N 40/1, 96/1), различные источники углерода (малат натрия, фруктоза) и азота (хлорид аммония, нитрат калия). Для исследуемых бактерий выявлены межштаммовые различия в способности к образованию флокул и подобраны оптимальные условия для их получения. Максимальная продукция флокул бактериями *A. brasilense* Sp7 (~67%) наблюдалась при применении фруктозы в качестве источника углерода, нитрата калия в качестве источника азота и при продолжительности выращивания 48 ч. В случае бактерий *A. brasilense* Sp245 флокуляция проявлялась исключительно в средах с малатом натрия и достигала максимальных значений (~82%) при использовании хлорида аммония в качестве источника азота через 120 ч культивирования. Гликополимеры исследуемых бактерий получали в препаративных количествах из культур, выращенных в оптимальных для формирования флокул условиях. Выходы ЭПС и КПС флокулирующих форм *A. brasilense* Sp7 и Sp245 в пересчете на единицу массы сухих клеток превышали выходы экстраклеточных гликанов тех же штаммов бактерий при росте в стандартной минеральной среде. Анализ моносакхаридного состава ЭПС, КПС и ЛПС, продуцируемых бактериями в условиях флокуляции, выявил увеличение содержания глюкозы по сравнению с гликополимерами планктонных форм бактерий. Полученные результаты свидетельствуют о том, что образование флокул азоспириллами сопровождается продукцией дополнительных полисахаридов, содержащих глюкозу. Сделано предположение, что подобные глюканы формируют фибриллярный материал, который окружает клетки и способствует их более прочному прикреплению как друг к другу, так и к поверхности корней растений.

Ключевые слова: *Azospirillum*, экзополисахарид, капсульный полисахарид, липополисахарид, флокуляция.

Введение. Флокуляция почвенных бактерий позволяет микроорганизмам эффективнее заселять поверхность корней за счет наличия «пребиопленочных» форм – агрегатов и флокул. Подобный «колониальный» тип организации представителей ассоциативной микрофлоры, в том числе бактерий рода *Azospirillum*

[1, 2], помогает им выживать при неблагоприятных воздействиях окружающей среды [3]. Исследование особенностей формирования флокул является актуальной задачей развития производства микробных биопрепаратов в качестве удобной естественной формы компактизации различных видов ризобактерий. Особое

ЕВСТИГНЕЕВА Стелла Сергеевна, Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, e-mail: Stels20295@yandex.ru

РЫБАЛЬЧЕНКО Дарья Александровна, Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, e-mail: arashis@mail.ru

СИГИДА Елена Николаевна – к.б.н., Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, e-mail: si_elena@mail.ru

ФЕДОНЕНКО Юлия Петровна – к.б.н., Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, e-mail: fedonenko_yu@ibppm.ru

КОННОВА Светлана Анатольевна – д.б.н., Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, e-mail: KonnovaSA@yandex.ru

внимание при этом уделяется структуре и свойствам экстраклеточных и мембранных гликополимеров, которые участвуют в реализации ключевых этапов образования растительно-микробной ассоциации на молекулярном уровне. К их числу относят экзополисахариды (ЭПС), продуцируемые бактериями в окружающую среду, полисахариды капсулы (КПС) и липополисахариды внешней мембраны (ЛПС). Известно, что структура и свойства бактериальных гликанов могут изменяться при адаптации бактерий *Azospirillum* к различным условиям существования [4, 5]. Сведения о структурных изменениях гликополимеров поверхности азоспирилл при переходе во флокулирующее состояние носят фрагментарный характер. Было показано возрастание содержания глюкозы в составе ЭПС и КПС бактерий *A. brasilense* Sp7 и Cd, выращенных в средах с разными соотношениями углерода к азоту [6]. В работе [7] была продемонстрирована корреляция степени агрегации бактериальных культур *A. brasilense* с количеством арабинозы в ЭПС. В связи с этим настоящей целью работы являлась оптимизация условий роста бактерий *A. brasilense* Sp7 и Sp245 для получения флокулирующих культур и анализ моносахаридного состава их ЭПС, КПС и ЛПС.

Материалы и методы. В работе использовали штаммы бактерий *A. brasilense* Sp7 (IBPPM150) и Sp245 (IBPPM219), любезно предоставленные коллекцией ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН (<http://collection.ibppm.ru/>). Культивирование азоспирилл осуществляли в синтетических питательных средах (табл. 1) в течение 120 ч при встряхивании на термостатированной качалке при температуре 30°C с частотой вращения 120 об/мин.

Количественную оценку агрегации бактериальных культур в контрольных и опытных условиях определяли согласно методике, описанной в работе [3].

Для получения ЭПС бактериальную культуру центрифугировали (30 мин, 3000×g) и отбирали культуральную жидкость, которую концентрировали на ротационном испарителе Laborota 4000-efficient («Heidolph», Германия) до минимального объема и диализовали против дистиллированной воды в мембранах с пределом исключения 12–14 кДа. Полученный рас-

твор смеси биополимеров вновь концентрировали, обрабатывали тремя объемами этилового спирта и выдерживали 24 ч при –20°C. Выпавший осадок ЭПС отделяли от спирторастворимых примесей центрифугированием (20 мин, 16000×g), затем ресуспендировали в воде и диализовали 24 ч против дистиллированной воды. Фракцию ЭПС очищали от низкомолекулярных примесей гель-фильтрацией на колонке с носителем Sepharose CL-6B («GE Healthcare», США). Высокомолекулярную фракцию ЭПС лиофилизировали с использованием BenchTop 2K («VirTis», США).

С поверхности бактериальных клеток смывали капсульный материал 0.15 М раствором хлорида натрия при механическом перемешивании на магнитной мешалке в течение 6 суток. Клетки ежедневно осаждали центрифугированием и ресуспендировали в свежей порции отмывающего раствора. Объединенные супернатанты концентрировали, диализовали через мембраны с пределом исключения 12–14 кДа против дистиллированной воды (72 ч) и лиофильно высушивали.

Бескапсульные бактериальные клетки обрабатывали ацетоном и диспергировали. ЛПС экстрагировали из ацетонового порошка (10 г) горячей смесью фенол–вода в соответствии с модифицированной методикой Вестфаля без разделения водного и фенольного слоев [10]. Полученный экстракт освобождали от фенола диализом против проточной воды (120 ч) и концентрировали. Белковые примеси удаляли из раствора ЛПС добавлением 40% трихлоруксусной кислоты до конечных значений pH 2.7 и последующим центрифугированием при 16000×g (20 мин). После освобождения от остатков кислоты диализом против дистиллированной воды (48 ч) экстракт ЛПС лиофилизировали.

Нейтральные моносахариды и аminosахара идентифицировали в исследуемых гликополимерах методом ГЖХ ацетатов полиолов [11] с использованием хроматографа GC-2010 («Shimadzu», Япония), снабженного капиллярной колонкой DB-5 («Hewlett-Packard», США). Градиент температуры от 160°C (1 мин) до 290°C, скорость нагрева 7°C/мин. Газовая хроматография проводилась в Центре коллективного пользования научным оборудованием в области физико-химической биологии и нанобиотехнологии «Симбиоз» ИБФРМ РАН.

Т а б л и ц а 1

Среды для культивирования бактерий *A. brasilense*, используемые в данной работе

Минеральная среда		Источник углерода, мм	Источник азота, мм	Соотношение С/Н
стандартная минеральная среда, MSM [8]		малат натрия, 37.3	NH ₄ Cl, 46.7	3.2/1
среды, индуцирующие флокуляцию	№1	малат натрия, 37.3	NH ₄ Cl, 3.73	40/1
	№2	малат натрия, 37.3	KNO ₃ , 3.73	40/1
	№3	фруктоза, 27.8	NH ₄ Cl, 4.2	40/1
	№4	фруктоза, 27.8	KNO ₃ , 4.2	40/1
	№5 [9]	фруктоза, 8	KNO ₃ , 0.5	96/1

Т а б л и ц а 2

Количественная оценка флокуляции бактерий *A. brasilense* Sp7 и Sp245 при культивировании на разных средах

Среда культивирования	Флокуляция, %		
	24 ч	48 ч	120 ч
<i>A. brasilense</i> Sp7			
MSM	1.4±0.2	1.4±0.2	2.5±0.3
№1	2.7±0.2	20.8±1.5	23.7±1.6
№2	2.9±0.1	2.5±0.4	3.1±0.1
№3	3.0±0.4	29.3±3.2	4.4±0.6
№4	31.0±3.5	58.3±5.3	9.3±0.8
№5	55.6±5.1	67.3±4.3	24.7±2.8
<i>A. brasilense</i> Sp245			
MSM	2.0±0.3	3.4±0.5	1.8±0.1
№1	40.2±3.1	65.5±2.3	81.8±2.0
№2	6.8±0.5	42.9±3.3	46.9±2.9
№3	1.3±0.1	3.2±0.3	1.3±0.1
№4	4.3±0.6	3.1±0.4	4.2±0.6
№5	1.2±0.1	1.4±0.1	1.5±0.1

Примечание. Доверительные интервалы приведены для надежности 95%.

Результаты и обсуждение. В качестве объектов исследования структурных особенностей экстраклеточных и мембранных гликополимеров бактерий *A. brasilense* при флокуляции были использованы экто- и эндосимбионтный штаммы Sp7 и Sp245, различающиеся стратегией колонизации корневой системы растений. Ранее нами было обнаружено, что при культивировании бактерий *A. brasilense* в условиях дефицита азота в питательных средах с соотношением С/Н, равным 40/1, независимо от природы источника углерода и азота наблюдалось образование клеточных агрегатов и флокул. Анализ электрофоретической подвижности выделенных ЭДТА-экстракцией компонентов наружных мембран флокулирующих культур

азоспирилл показал наличие ряда изменений по сравнению с планктонными формами. С учетом полученных данных нами были отобраны несколько вариантов сред, индуцирующих флокуляцию исследуемых культур (табл. 1).

Результаты скрининга флокулообразующей способности бактерий *A. brasilense* Sp7 и Sp245 в используемых средах на первые, вторые и пятые сутки культивирования представлены в табл. 2. Для типового штамма *A. brasilense* Sp7 наибольшее образование агрегатов и флокул было выявлено при росте в течение 48 ч в средах с фруктозой (№ 3–5), а также в среде с малатом натрия и хлоридом аммония (№1) через 120 ч. Максимальный уровень флокуляции (~67%) был отмечен при культиви-

ровании в среде (№5) с фруктозой и нитратом калия (C/N равное 96/1). Обнаруженные отличия в динамике флокуляции бактерий *A. brasilense* Sp7 в средах с фруктозой или малатом натрия, вероятно, обусловлены особенностями катаболизма органических кислот и моносахаридов у азоспирилл, сопровождающимися разнонаправленным изменением pH среды культивирования. Для бактерий *A. brasilense* Sp245 флокуляция наблюдалась исключительно в средах с малатом натрия (№1–2) и достигала максимальных значений (~82%) при использовании хлорида аммония в качестве источника азота через 120 ч роста (табл. 2).

Штаммовая вариабельность способности к флокулообразованию у бактерий *A. brasilense* Sp7 и Sp245, вероятно, связана с особенностями их взаимодействия с растением-партнером. Яблочная кислота и ее соли являются одним из основных компонентов корневых выделений ряда злаков. Фруктоза присутствует среди внутриклеточных метаболитов, а также входит в состав многих транспортных ди-, три- и тетрасахаридных форм, распространенных в различных растениях. Таким образом, формирование агрегатов и флокул стимулируется при условии дефицита азота и в присутствии источника углерода, к которому бактерии наименее адаптированы, что позволяет рассматривать флокулообразование как ответную реакцию бактерий на стресс.

Для выделения препаративных количеств экстраклеточных (ЭПС и КПС) и мембранных (ЛПС) гликополимеров бактерии *A. brasilense* выращивали при оптимальных для флокуляции условиях (48 ч в среде №5 и 120 ч в среде №1 для штаммов Sp7 и Sp245 соответственно). Выходы ЭПС для флокулирующих форм *A. brasilense* Sp7 и Sp245 в пересчете на единицу массы сухих клеток составляли 10.4 и 12.1%, КПС – 4.5 и 7.6%, а ЛПС – около 6%. Эти значения превышали аналогичные для гликополимеров тех же штаммов бактерий, культивирование которых осуществлялось в MSM: для ЭПС – приблизительно в два раза, для КПС – приблизительно в полтора раза. Существенных отличий в продукции ЛПС планктонными и флокулирующими культурами отмечено не было. Полученные данные могут свидетельствовать об участии экстраклеточных гликополимеров бактерий *A. brasilense* в формировании клеточных агрегатов и флокул.

Анализ моносахаридного состава выделенных препаратов методом ГЖХ ацетатов полио-

лов (рис. 1) выявил наличие сахаров, характерных для гликополимеров данных штаммов (рамнозы в препаратах штамма Sp245 [4], рамнозы, фукозы, ксилозы, галактозы и глюкозамина в препаратах штамма Sp7 [12]). Помимо этого, отмечен рост содержания глюкозы в ЭПС бактерий флокулирующих культур в среднем на 20% по сравнению с ЭПС исследуемых бактерий, выращенных в MSM. Подобная тенденция увеличения доли глюкозы была выявлена также для КПС – на 50% для бактерий *A. brasilense* Sp7 и на 21% для *A. brasilense* Sp245, и в меньшей степени для ЛПС – на 12 и 7% для штаммов Sp7 и Sp245 соответственно (рис. 1).

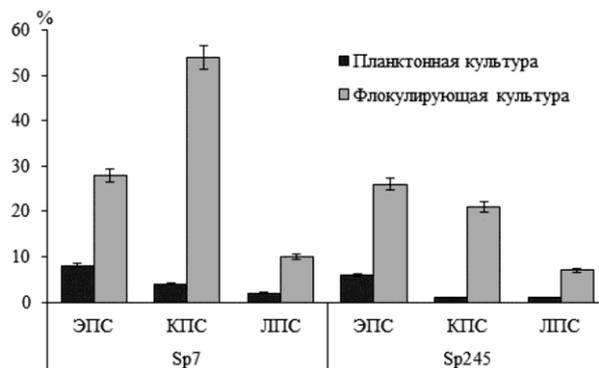


Рис. 1. Содержание глюкозы (% от суммы идентифицированных моносахаридов) в образцах ЭПС, КПС и ЛПС бактерий *A. brasilense* Sp7 и Sp245 планктонных и флокулирующих культур. Доверительные интервалы приведены для надежности 95%

Повышение содержания глюкозы в КПС отмечалось ранее для штаммов *A. brasilense* Cd и *A. lipoferum* Col5 при увеличении продолжительности культивирования до 72 ч [5], а для штамма *A. brasilense* Sp7(S) – при выращивании на протяжении 120 ч в среде с глюконатом калия в качестве источника углерода [12]. Для бактерий *A. brasilense* Sp245, выращенных в среде с фруктозой и хлоридом аммония при стандартном соотношении C/N, равном 3.2/1, в составе ЛПС и КПС было показано наличие дополнительного гомоглюкана следующей структуры: $[\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-Glcp}\text{-}(1\rightarrow)]_n$ [4]. Предполагается, что глюканы участвуют в формировании фибриллярного материала, задействованного в прочном прикреплении, или заякоривании, азоспирилл на поверхности корней растений. Вероятно, синтез фибриллярного материала, окружающего клетки, также способствует их агрегации и прочному прикреплению друг к другу, индуцируя образование флокул.

На основании полученных данных можно сделать предположение, что образование флокул у азоспирилл реализуется в стрессовых условиях и сопровождается продукцией дополнительных полисахаридов, содержащих глюкозу. Таким образом, альтернативный способ биосинтеза экстраклеточных и мембранных гликополимеров, используемый азоспириллами, позволяет им быстрее адаптироваться к изменениям окружающей среды и повышать эффективность колонизации макропартнеров.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ (проект 18-34-00089 мол_а).

Литература

1. Кудоярова Г.Р., Курдиш И.К., Мелентьев А.И. Образование фитогормонов почвенными и ризосферными бактериями как фактор стимуляции роста растений // Известия Уфимского научного центра РАН. 2011. №3–4. С. 5–16.
2. Аленькина С.А., Никитина В.Е. Влияние лектинов эндофитного и эпифитного штаммов азоспирилл на активность пектинолитических ферментов растительной клетки // Известия Уфимского научного центра РАН. 2017. № 1. С. 49–53.
3. Madi L., Henis Y. Aggregation in *Azospirillum brasilense* Cd: Conditions and factors involved in cell-to-cell adhesion // Plant Soil. 1989. Vol. 115. P. 89–98.
4. Евстигнеева С.С., Сигида Е.Н., Федоненко Ю.П., Коннова С.А., Игнатов В.В. Структурные особенности капсульных и О-полисахаридов бактерий *Azospirillum brasilense* Sp245 при изменении условий культивирования // Микробиология. 2016. Т. 85, № 6. С. 643–651.
5. Del Gallo M., Haegi A. Characterization and quantification of exocellular polysaccharides in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum* // Symbiosis. 1990. Vol. 9. P. 155–161.
6. Burdman S., Jurkevitch E., Soria-Díaz M.E., Gil Serrano A.M., Okon Y. Extracellular polysaccharide composition of *Azospirillum brasilense* and its relation with cell aggregation // FEMS Microbiol. Lett. 2000. Vol. 189. P. 259–264.
7. Bahat-Samet E., Castro-Sowinski S., Okon Y. Arabinose content of extracellular polysaccharide plays a role in cell aggregation of *Azospirillum brasilense* // FEMS Microbiol. Lett. 2004. Vol. 237. P. 195–203.
8. Konnova S.A., Makarov O.E., Skvortsov I.M., Ignatov V.V. Isolation, fractionation and some properties of polysaccharides produced in a bound form by *Azospirillum brasilense* and their possible involvement in *Azospirillum*-wheat root interactions // FEMS Microbiol. Lett. 1994. Vol. 118. P. 93–99.
9. Sadasivan L., Neyra C.A. Flocculation in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*:

exopolysaccharides and cyst formation // J. Bacteriol. 1985. Vol. 163. P. 716–723.

10. Кульшин В.А., Яковлев А.П., Аваева С.Н., Дмитриев Б.А. Улучшенный метод выделения липополисахаридов из грамтрицательных бактерий // Мол. генетика, микробиология и вирусология. 1987. № 5. С. 44–46.

11. Sawardeker J.S., Sloneker J.H., Jeanes A. Quantitative determination of monosaccharides as their alditol acetates by gas liquid chromatography // Anal. Chem. 1965. Vol. 37. P. 1602–1604.

12. Коннова С.А., Федоненко Ю.П., Макаров О.Е., Игнатов В.В. Исследование влияния условий выращивания бактерий *Azospirillum brasilense* на состав их внеклеточных полисахаридсодержащих материалов // Изв. РАН. Сер. биол. 2003. Вып. 4. С. 430–437.

References

1. Kudoyarova G.R., Kurdish I.K., Melentyev A.I. Production of phytohormones by soil and phizosphere bacteria as a factor of plant growth stimulation. Izvestiya Ufimskogo nauchnogo tsentra RAN, 2011, no. 3–4, pp. 5–16.
2. Alenkina S.A., Nikitina V.E. Effect of lectins of endophytic and epiphytic *Azospirillum* strains on the activity of pectinolytic enzymes in wheat seedling roots. Izvestiya Ufimskogo nauchnogo tsentra RAN, 2017, no. 1, pp. 49–53.
3. Madi L., Henis Y. Aggregation in *Azospirillum brasilense* Cd: Conditions and factors involved in cell-to-cell adhesion. Plant Soil, 1989, vol. 115, pp. 89–98.
4. Yevstigneyeva S.S., Sigida E.N., Fedonenko Yu.P., Konnova S.A., Ignatov V.V. Structural properties of capsular and O-specific polysaccharides of *Azospirillum brasilense* Sp245 under varying cultivation conditions. Microbiology, 2016, vol. 85, no. 6, pp. 664–671.
5. Del Gallo M., Haegi A. Characterization and quantification of exocellular polysaccharides in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*. Symbiosis, 1990, vol. 9, pp. 155–161.
6. Burdman S., Jurkevitch E., Soria-Díaz M.E., Gil Serrano A.M., Okon Y. Extracellular polysaccharide composition of *Azospirillum brasilense* and its relation with cell aggregation. FEMS Microbiol. Lett., 2000, vol. 189, pp. 259–264.
7. Bahat-Samet E., Castro-Sowinski S., Okon Y. Arabinose content of extracellular polysaccharide plays a role in cell aggregation of *Azospirillum brasilense*. FEMS Microbiol. Lett., 2004, vol. 237, pp. 195–203.
8. Konnova S.A., Makarov O.E., Skvortsov I.M., Ignatov V.V. Isolation, fractionation and some properties of polysaccharides produced in a bound form by *Azospirillum brasilense* and their possible involvement in *Azospirillum*-wheat root interactions. FEMS Microbiol. Lett., 1994, vol. 118, pp. 93–99.
9. Sadasivan L., Neyra C.A. Flocculation in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*:

exopolysaccharides and cyst formation. *J. Bacteriol.*, 1985, vol. 163, pp. 716–723.

10. Kulshin V.A., Yakovlev A.P., Avaeva S.N., Dmitriev B.A. Simplified method for lipopolysaccharide isolation from gram-negative bacteria. *Mol. Genet. Mikrobiol. Virusol.*, 1987, no. 5, pp. 44–46.

11. Sawardeker J.S., Sloneker J.H., Jeanes A. Quantitative determination of monosaccharides as their

alditol acetates by gas liquid chromatography. *Anal. Chem.*, 1965, vol. 37, pp. 1602–1604.

12. Konnova S.A., Fedonenko Yu.P., Makarov O.E., Ignatov V.V. Effect of cultivation conditions on the composition of extracellular polysaccharide-containing substances in the bacterium *Azospirillum brasilense*. *Biology Bulletin*, 2003, vol. 30, no. 4, pp. 354–360.

— — — — —

OPTIMIZATION OF CONDITIONS FOR OBTAINING FLOCCULATING CULTURES OF BACTERIA *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* Sp7 AND Sp245 AND MONOSACCHARIDE COMPOSITION OF THEIR GLYCOPOLYMERS

© S.S. Yevstigneyeva¹, D.A. Rybalchenko², E.N. Sigida¹, Yu.P. Fedonenko¹, S.A. Konnova²

¹Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms
of the Russian Academy of Sciences,
13, Prospekt Entuziastov, 410049, Saratov, Russian Federation

²Saratov State University,
83, ulitsa Astrakhanskaya, 410012, Saratov, Russian Federation

The growth time and the medium composition for the associative nitrogen-fixing rhizobacteria *Azospirillum brasilense* Sp7 and Sp245 were varied to examine the bacteria's floc-forming ability. Exopolysaccharides (EPSs), capsular polysaccharides (CPSs), and lipopolysaccharides (LPSs) were isolated from the outer membranes of flocculating cultures, and their monosaccharide composition was characterized. In optimizing the conditions for floc formation, we used nitrogen-deficient media (C/N ratios, 40/1 and 96/1) and different sources of carbon (sodium malate, fructose) and nitrogen (ammonium chloride, potassium nitrate). Interstrain differences in the floc-forming ability were found, and the optimal conditions for floc formation were chosen. Floc production by *A. brasilense* Sp7 was maximal (~67%) when fructose was used as the carbon source, potassium nitrate was used as the nitrogen source, and the growth time was 48 h. With *A. brasilense* Sp245, flocculation was observed only on media with sodium malate and was maximal (~82%) when ammonium chloride was used as the nitrogen source and the growth time was 120 h. The bacterial glycopolymers were obtained in preparative quantities from cultures grown under conditions optimal for floc formation. The EPS and CPS yields of the flocculating forms of Sp7 and Sp245, per unit weight of dry cells, were greater than those of the same strains grown in a standard mineral medium. Analysis of the monosaccharide compositions of the EPSs, CPSs, and LPSs of the flocculating forms showed an increased content of glucose, as compared with the glycopolymers of the planktonic forms of Sp7 and Sp245. Our results indicate that floc formation by *Azospirillum* is accompanied by production of additional glucose-containing polysaccharides. We speculate that such polysaccharides form the fibrillar material around the cells, which helps the cells to better attach to each other and to the plant root surface.

Key words: *Azospirillum*, exopolysaccharide, capsular polysaccharide, lipopolysaccharide, flocculation.