

Министерство образования и науки Российской Федерации  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
ИМЕНИ Н.Г.ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра генетики


**ВЛИЯНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ В СИНТЕЗЕ  
ПОЛИСАХАРИДОВ НА УСТОЙЧИВОСТЬ БАКТЕРИЙ  
*AZOSPIRILLUM BRASILENSE*  
К НЕГАТИВНОМУ ВОЗДЕЙСТВИЮ МЕДИ**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ ДИПЛОМНОЙ РАБОТЫ  
студента 4 курса 422 группы  
направления подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология  
биологического факультета  
Синякина Дмитрия Николаевича

Научный руководитель:

доцент кафедры генетики,

к.б.н.

 7.06.16 Т.А.Алаторцева

Научный консультант:

ведущий научный сотрудник

лаборатории генетики и

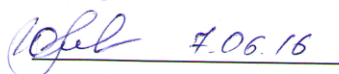
микроорганизмов

ИБФРМ РАН, д.б.н.

Зав. кафедрой генетики,

д.б.н.

 7.06.16 А.В. Шелудько

 7.06.16 О.И.Юдакова

Саратов 2016

## ВВЕДЕНИЕ

Азоспириллы – ризобактерии, стимулирующие рост и развитие растений, благодаря своей способности к фиксации атмосферного азота, продукции фитогормонов, контролю фитопатогенов и др. Выявлено влияние динамики генома *A. brasilense* на устойчивость бактерий к ионам кобальта (II), меди (II), серебра (I) и цинка (II). Механизмы, обеспечивающие устойчивость микробов к ионам тяжелых металлов и поддержание гомеостаза тех из них, которые существенны для жизнедеятельности, тесно переплетаются. Ионы меди необходимы для многих биохимических реакций, в то же время медь относится к группе тяжелых металлов, которые в повышенных концентрациях токсичны для почвенной микрофлоры, ингибируют многие микробиологические процессы, снижают урожайность и содержание питательных элементов в растениях

В природных экосистемах большинство бактерий существуют в виде прикрепленных к субстратам биопленок, формирование которых является одной из стратегий выживания бактерий в окружающей среде. Учитывая то обстоятельство, что в случае ассоциативного взаимодействия не происходит образования каких-либо специфических структур, наподобие клубеньков, характерных для бобово-ризобияльного симбиоза, формирование азоспириллами биопленок может играть существенную роль в успешном функционировании ассоциации. Спонтанные или индуцированные изменения состава и (или) структуры плазмид штамма *A. brasilense* Sp245 с тонкими различиями в антигенной структуре и заряде пента-D-рамнанового O-полисахарида (ОПС)/олигосахарида кора липополисахарида, приводящие к дефектам в образовании липополисахаридов, полисахаридов, связывающих калькофлуор (Cal- фенотип), и полярного жгутика, оказывают заметное влияние на эффективность формирования биопленок азоспирилл на абиотических поверхностях, вполне вероятно, что изменение структуры O-специфических полисахаридов (ОПС) и физико-химических свойств липополисахаридов (ЛПС, Lps), синтезируемых бактериями, способно



оказать влияние на формирование микроорганизмами биопленок *inplanta* и эффективность функционирования ассоциативного симбиоза с растениями в условиях повышенного содержания ионов тяжелых металлов.

Цель данной работы:

Определить характер воздействия различных концентраций ионов меди на рост бактериальных культур, формирование биопленок *inplanta* и абиотических поверхностях штаммом *A. brasilense* Sp245 и его оригинальными мутантами по продукции поверхностных полисахаридов.

Для реализации цели исследования были поставлены и решались следующие задачи:

1. Провести анализ влияния различных концентраций  $\text{CuSO}_4$  на рост бактериальных культур и способность клеток штамма *A. Brasilense* Sp245 и его мутантов с изменениями в продукции поверхностных гликополимеров накапливать медь.

2. Исследовать влияние меди на процесс колонизации корневой системы проростков пшеницы и формирования биопленок культурами штамма *A. Brasilense* Sp245 и его мутантов с изменениями в структуре клеточной поверхности и подвижности.

3. Сравнить уровень продукции полисахаридов клетками родительского штамма и мутантов в процессе колонизации бактериями корневой системы проростков пшеницы и формирования биопленок.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### Штаммы и условия культивирования бактерий

Бактериальные штаммы *Azospirillum brasilense*, использованные в работе, представлены в таблице 1.

Таблица 1 - Бактериальные штаммы *A. brasilense*, использованные в работе

Штамм	Характеристика
Sp245	Дикий тип, выделен в Бразилии из корней пшеницы
KM018	Cal LpsII <sup>-</sup> -мутант Sp245 (p120::Omegon-Km), Km <sup>R</sup>
KM139	LpsII <sup>-</sup> -мутант Sp245 (p120::Omegon-Km), Km <sup>R</sup>
KM252	Cal LpsI <sup>-</sup> -мутант Sp245 (p120::Omegon-Km), Km <sup>R</sup>

### Растительный объект, используемый в работе

Семена мягкой яровой пшеницы (*Triticum aestivum* cv. Саратовская 29) предоставлены НИИ сельского хозяйства Юго-Востока РАСХН (г. Саратов).

### Определение уровня устойчивости бактерий к ионам меди

Бактерии выращивали в жидкой среде, культуры доводили до одинаковой оптической плотности и рассеивали из серийных разведений на плотную среду с различной концентрацией сульфата меди. Для определения влияния меди на рост бактерий в жидкой среде 18-ч культуры, выращенные в жидкой MSM, инокулировали в жидкие MSM с 0.01% дрожжевого экстракта



и различными концентрациями  $\text{CuSO}_4$  до  $A_{590}=0.05-0.10$  ( $l=1$  см). Инкубировали с аэрацией при 140 об/мин и  $30^\circ\text{C}$ . Через 24 ч инкубации измеряли  $A_{590}$  ( $l=1$  см).

Для изучения влияния меди на способность бактерий формировать биопленки на полистироле или на корнях проростков пшеницы в среды перед инокуляцией бактерий вносили различные концентрации  $\text{CuSO}_4$ .

#### **Оценка относительного количества биомассы бактерий, формирующих биопленку**

Ночные культуры бактерий в MSM разводили стерильной средой в 100 раз, вносили суспензии в ячейки полистирольных планшетов с 96 лунками (по 200 мкл) и инкубировали без встряхивания при  $30^\circ\text{C}$  7 суток. Планктонные бактерии удаляли аспирацией, ячейки планшетов осторожно промывали водой, добавляли соответствующий объем 1% водного раствора красителя кристаллического фиолетового, инкубировали при комнатной температуре 10 мин, удаляли раствор и осторожно промывали планшеты водой. Для оценки биомассы бактерий связавшийся с биопленками краситель растворяли в 200 мкл (в лунке планшета) этанола и измеряли оптическую плотность раствора при  $A_{570}$ .

#### **Определение численности бактериальных клеток на корнях**

Трех- или 10-дневные проростки переносили в стерильный ФСБ, однократно отмывали (5 мин), у трех растений отделяли корни, которые затем взвешивали и гомогенизировали в ФСБ. Гомогенат использовали для определения численности бактерий методом подсчета количества колониеобразующих единиц (КОЕ) и для иммуноферментного анализа. При определении КОЕ из каждой пробы готовили два параллельных ряда разведений. Высевы приводили на плотную MSM, в которую по необходимости добавляли канамицин. Для контроля наличия посторонней микрофлоры на корнях параллельно высевы проводили на среду LB с канамицином и без него. Количество бактерий, высеваемых с корней,



пересчитывали на одно растение. Во всех случаях проводили не менее девяти независимых экспериментов.

#### **Иммуноферментный анализ (ИФА)**

Для ИФА заселенные бактериями или стерильные (использовали в качестве контроля) гомогенаты корней разводили в 80 раз и вносили по 50 мкл в лунки полистироловых 96-луночных планшетов. Выдерживали в течение 30 мин на виброшейкере при комнатной температуре, затем стационарно в течение 18 ч – при 4°C. Бактериальные полисахаридные или белковые антигены выявляли, используя Ат 1 или Ат 2 соответственно. В качестве вторых Ат выступали козы анти-кроличьи Ат, конъюгированные с пероксидазой хрена в концентрации 1 мкг/мл.

ИФА материала биопленок, сформированных бактериями на полистироле. ИФА выполняли в полистироловых планшетах с 96 лунками. Для выявления штаммоспецифичных полисахаридных антигенов использовали Ат 1. Для выявления поверхностных антигенов белковой природы использовали Ат 2. Концентрация Ат 1 и Ат 2 во всех экспериментах составляла 50 мкг/мл. В качестве вторых Ат выступали козы антикроличьи Ат, конъюгированные с пероксидазой хрена (1 мкг/мл).

ИФА материала биопленок, формируемых на полистироле, проводили непосредственно в лунках планшетов по окончании культивирования в них бактерий. После удаления суспензий бактерий в лунки планшетов вносили по 100 мкл 0.05% раствора PEG-2000 для блокирования свободных сайтов на полистироле.

#### **Определение аккумуляции меди бактериальными клетками и проростками пшеницы**

Бактериальные культуры выращивали в жидкой MSM в присутствии 0.001, 0.5 или 1.0 мМ CuSO<sub>4</sub> при перемешивании в течении 18 ч. Клетки отделяли от культуральной жидкости центрифугированием. Ресуспендировали в 50 мМФСБ (рН 7.0) и осаждали. Осадок клеток высушивали при 70 °С до постоянного веса. В случае растительных образцов



(выращенных в присутствии меди) надземную часть и корневую систему отделяли от зерновки, разделяли промывали ФСБ и высушивали при 70 °С до постоянного веса. Навески высушенных образцов использовали для анализа.

#### **Определение морфометрических и морфофизиологических параметров проростков пшеницы.**

Линейный размер надземной части проростков (в мм) определяли от первого узла кущения до верхушки первого листа. В случае корневой системы измеряли длину всех корешков в корневой системе (в мм), затем определяли средний размер корня для каждого растения. Также для каждого растения определяли процент разветвленных корней (корни с боковыми отростками) в корневой системе. Для определения морфофизиологического показателя – сухого веса (в мг) надземную часть и корневую систему отделяли от зерновки, разделяли и высушивали при 70 °С до постоянного веса. Перед высушиванием корни 3-5 растений объединяли. Данные измерений морфометрических и морфофизиологических параметров выражали в процентах от контроля – среднего значения исследованных параметров стерильных растений, выращенных в сходных условиях.

Деформацию корневых волосков оценивали в четырех независимых экспериментах при микроскопии корней, определяя процент искривленных от общего числа волосков на 50-90 произвольно выбранных участках корня.

#### **Результаты и обсуждение**

##### **Влияние ионов меди на жизнеспособность *A. brasilense* Sp245 и его дериватов с мутациями в структуре полисахаридов**

. Ионы меди в высоких концентрациях негативно влияют на рост и метаболизм бактерий рода *Azospirillum*. При культивировании с 0.2 мМ  $\text{CuSO}_4$  клетки  $\text{CaI}^-$  мутанта лишеного нейтрального  $\text{LpsKM018}$  аккумулируют в 2.2 больше меди по сравнению с показателем Sp245. Бактерии сохраняющего синтез полисахаридов связывающих калькофлюор  $\text{LpsII}^-$  мутанта KM139 в сходных условиях содержат в 2.8 раза



больше металла ( $2.1 \pm 0.5$ ). После культивирования с 0.5 мМ меди ее содержание в клетках Sp245 возрастает в 1.8 раз по сравнению с величиной, характерной для клеток этого штамма, выращенных с 0.2 мМ  $\text{CuSO}_4$ . Медь в количестве 0.5 мМ подавляет рост культуры Sp245, а в случае мутантов ингибирует. Медь в количестве 0.9 мМ ингибирует рост культур Sp245 в жидкой MSM..

Медь в количестве, ингибирующем рост жидких планктонных культур (0.5 мМ или 1.0 мМ) не препятствует формированию бактериями биопленок. Однако биомасса биопленок Sp245 и KM139 под средой с 0.5 или 1.0 мМ меди на 70-80 % ниже показателя каждого штамма в контроле, содержащем 0.001 мМ металла. В случае KM252 снижение биомассы составляет 50-60 %. Биомасса биопленок KM018 не зависит от количества меди в среде. В присутствии 4.0 мМ сульфата меди штамм Sp245 не образует пленку. В случае мутантов KM018, KM139 и KM252 формирование биопленок ингибирует  $\text{CuSO}_4$  в количестве 2.0 мМ.

Таким образом, изменения в продукции липополисахаридов обуславливают снижение устойчивости производных штамма *A. Brasilense* Sp245 к токсическому действию меди и увеличение ее накопления бактериальными клетками.

#### **Влияние ионов меди на численность бактерий, обитающих в корневой системе проростков пшеницы**

Количество клеток *A. brasilense*, прикрепившихся к корням, стабилизируется в течение 3 ч инкубации суспензии бактерий с трехсуточными проростками пшеницы, как в случае штамма Sp245 дикого типа, так и его дериватов, имеющих мутации в структуре полисахаридов. Мутанты, утратившие один из ЛПС (LpsI или LpsII), адсорбируются на корнях хуже штамма Sp245. Как видно на рисунке 3, через 7 дней культивирования инокулированных растений в присутствии 0.001 мМ  $\text{CuSO}_4$  численность Sp245 и мутантов KM139 и KM252 снижается в 1.6–3.3 раза. Медь в концентрации 0.001 мМ не оказывает влияния на рост азоспирилл,



что позволяет объяснить снижение числа бактерий на корнях растущих проростков миграцией в среду для выращивания растений части адсорбированных клеток. Популяция неподвижного мутанта КМ018, обитающая в корневой системе, за 7 суток инкубации остается неизменной, что характерно для мутантов штамма Sp245, утративших способность к подвижности при помощи жгутиков.

Численность бактерий всех штаммов, высеваемых с корней растений после инокуляции, существенно снижается лишь в случае проростков, инкубированных в присутствии 5 мМCuSO<sub>4</sub>. Из корневой системы высеваются единичные колонии, вероятно являющиеся потомками покоящихся форм азоспирилл. Концентрация меди 5 мМ ингибировала рост не только бактериальной популяции, но и растений, что позволяет предположить наличие некоторой зависимости жизнеспособности азоспирилл в условиях высокого содержания ионов меди в среде инкубации от физиологического состояния растительного партнера.

По сравнению с Sp245, его мутанты КМ252, КМ139 и КМ018 хуже адсорбируются на корнях в течении 3 ч и колонизируют корневую систему к 7-м суткам инкубации как в присутствии меди, не влияющей на рост бактериальных культур без растений, так и при 0.5 и 1.0 мМ. Таким образом, жизнеспособность *A. brasilense*Sp245 и мутантов этого штамма в условиях высокого содержания меди во внешней среде, как и численность клеток, колонизирующих корни, зависят от характеристик синтезируемых бактериями полисахаридов. С другой стороны, условия существования в корневой системе проростков пшеницы способствуют повышению устойчивости азоспирилл к ионам меди.

#### **Аккумуляция меди корневой системой проростков пшеницы**

Исследования накопления меди пшеницей показали, что содержание меди в корневой системе проростков, выращенных в присутствии 0.5 или 1.0 мМCuSO<sub>4</sub>, как минимум, на порядок уступает количеству меди в среде



инкубации. По-видимому, низкая концентрация меди, содержащаяся в корнях, позволяет бактериям, обитающим в корневой системе, сохранять жизнеспособность в условиях высокого содержания меди во внешней среде .

#### **Характеристика биопленок, формируемых бактериями в процессе колонизации корней пшеницы**

На корневой поверхности биопленки, сформированные азоспириллами к 7-м суткам инкубации, располагаются не равномерно по всему корню, а преимущественно в зоне всасывания и верхушки корня. Бактериальные скопления наблюдаются у мест соединения корневых волосков с поверхностью корня, около кончика корневого волоска, а также встречаются корневые волоски, заселенные бактериями вдоль всей поверхности . Азоспириллы формируют биопленки не только в зоне всасывания, но и в других зонах, в том числе на поверхности верхушки корня. В присутствии 0.5 и 1.0 мМ меди бактерии предпочитают заселять преимущественно зону корневых волосков, формируя биопленку вдоль корневого волоска. Однако, концентрация ионов меди в среде инкубации не влияют на морфологию биопленок.

В случае штаммов Sp245, KM018, KM139 или KM252 биопленки представлены скоплениями агрегатов бактериальных клеток. Образование клеточных агрегатов на корнях растений характерно для азоспирилл. Предполагают, что клеточными структурами, определяющими агрегацию, могут быть капсульные полисахариды, ЭПС или белки внешней мембраны бактерий, возможно, обеспечивающие их перемещение по корневой системе .

Степень выраженности биопленок на поверхности корня в случае всех штаммов согласуется с численностью бактерий, заселивших корневую систему.

Таким образом, синтез бактериями полноценного ЛПС и ПССК во многом определяет численность клеток штамма Sp245, колонизирующих корни и формирующих биопленки, степень выраженности биопленок.



По результатам исследований можно сделать следующие выводы:

1. Изменения в продукции липополисахаридов у производных штамма *A. brasilense*Sp245 обуславливают снижение устойчивости к токсическому действию меди и увеличение ее накопления бактериальными клетками.
2. Повышению устойчивости бактерий *A. brasilense* к негативному влиянию ионов меди способствует формирование ими биопленок.
3. Избыток меди в среде инкубации способствует увеличению содержания полисахаридных антигенов в биопленках, сформированных *in planta* и/или на модельной поверхности полистирола штаммом *A. brasilense* Sp245 и его мутантами с измененным составом гликополимеров.

