

Министерство образования и науки Российской Федерации

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»


Кафедра биохимии и биофизики

Работа выполнена  
на базе УНЦ физико-химической биологии  
СГУ и ИБФРМ РАН

**ОСОБЕННОСТИ ПОЛУЧЕНИЯ ПОКОЯЩИХСЯ КУЛЬТУР  
БАКТЕРИЙ РОДА *AZOSPIRILLUM*  
АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ**


студентки 4-го курса 422 группы  
направления 060301 Биология  
биологического факультета  
Миловой Оксаны Алексеевны

Научный руководитель:  
профессор кафедры биохимии  
и биофизики, д.б.н.

  
14.06.2017


Е.В. Плешакова

Научный консультант:  
в.н.с. ИБФРМ РАН, д.б.н.

  
14.06.2017

Л.П. Антонюк

Зав. кафедрой биохимии и биофизики,  
д.б.н., профессор

  
14.06.2017

С.А. Коннова

Саратов 2017

**Введение.** Азоспириллы (лат. *Azospirillum*) – род бактерий из семейства *Rhodospirillaceae* класса альфа-протеобактерий, представленный в настоящее время 18-ю видами. Большинство представителей данного рода являются природными симбионтами высших растений, в том числе пшеницы, риса и других злаков [1]. Азоспириллы относятся к неспорообразующим бактериям и при неблагоприятных условиях формируют цисты.

В последние десятилетия уделяется большое внимание изучению состояния покоя у бактерий и получению некультивируемых форм значимых для человека микроорганизмов [2]. Физиологические переходы покой–размножение у микроорганизмов мало изучены, что связано, прежде всего, с методическими трудностями получения их покоящихся форм. Что касается рода *Azospirillum* – подходы к получению покоящихся бактерий были разработаны и опробованы к началу нашей работы только на одном штамме – *A. brasilense* Sp245 [3, 4]. Учитывая тот факт, что данный штамм обладает некоторыми уникальными чертами [1, 3], нельзя быть уверенным, что предложенный для Sp245 протокол подойдет для получения некультивируемых клеток других штаммов *A. brasilense*, а также других видов рода *Azospirillum*.

Исходя из вышеизложенного, целью работы было получение, с использованием комплекса стрессовых факторов, и частичная характеристика покоящихся культур пяти представителей рода *Azospirillum*: *A. brasilense* SR80, *A. doebereinae* GSF71, *A. thiophilum* VSU BV-S, *A. fermentarium* CC-LY743 и *A. melinis* TMCY 0552.

Для реализации поставленной цели решались следующие задачи:

1. Получение покоящихся культур *A. brasilense* SR80, *A. doebereinae* GSF71, *A. thiophilum* VSU BV-S, *A. fermentarium* CC-LY743 и *A. melinis* TMCY 0552 с использованием комплекса стрессовых факторов.
2. Тестирование колониеобразующей способности клеток полученных культур.

3. Оценка возобновления роста азоспирилл в свежей жидкой среде, в том числе, в присутствии потенциальных индукторов выхода из покоя.

4. Характеристика полученных покоящихся культур с использованием световой микроскопии.

**Структура и объем работы.** Бакалаврская работа состоит из введения, 3 глав (обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследований и их обсуждение), заключения, выводов, списка цитированной литературы. Список литературы включает 69 источников на русском и английском языках. Работа изложена на 65 страницах машинописного текста.

**Основное содержание работы.** В обзоре литературы бакалаврской работы описаны современные представления о физиологическом состоянии покоя у бактерий, о переходах покой–размножение у микроорганизмов, о видовом разнообразии рода *Azospirillum*. В разделе, посвященном материалам и методам исследования, представлена информация об объектах исследования и методах, использованных в ходе выполнения экспериментов.

Объектами исследования были 5 штаммов: *A. brasilense* SR80, *A. doebereinae* GSF71, *A. thiophilum* VSU BV-S, *A. fermentarium* CC-LY743 и *A. melinis* TMCY 0552, полученных из Коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН. Во всех случаях, за исключением экспериментов по получению покоящихся культур, бактерии культивировали с использованием синтетической малатной среды (СМС) следующего состава (г/л):  $K_2HPO_4 \times 3H_2O$  – 3,0;  $KH_2PO_4$  – 2,0; NaCl – 0,1;  $NaMoO_4 \times 2H_2O$  – 0,002; NaOH – 2,24; яблочная кислота – 3,76;  $NH_4Cl$  – 0,5; дрожжевой экстракт – 0,1;  $MgSO_4 \times 7H_2O$  – 0,2;  $CaCl_2 \times 2H_2O$  – 0,02;  $FeSO_4 \times 7H_2O$  – 0,02 (вносили в виде хелата) [4].

Бактерии выращивали при температуре 31°C в жидкой или на твердой СМС, pH среды 6,8. В качестве инокулята во всех экспериментах использовали культуру ранней стационарной фазы роста. Для получения покоящихся культур *A. brasilense* SR80 и *A. doebereinae* GSF71 аликвоту

вегетативной культуры вносили в физиологический раствор (0,9% NaCl), содержащий 4-н-гексилрезорцин и CuSO<sub>4</sub> в концентрациях 0,3 и 0,4 мМ, соответственно. Объем вносимой культуры составлял 10<sup>6</sup> кл./мл. Число бактериальных клеток определяли, используя микробиологический стандарт мутности.

Использование совокупности перечисленных выше стрессовых факторов позволяло получить покоящуюся культуру *A. brasilense* SR80, но не *A. doebereinae* GSF71, так как такой стресс для штамма GSF71 был чрезмерным. В связи с этим для получения бактерий *A. doebereinae*, *A. thiophilum*, *A. fermentarium* и *A. melinis* в физиологическом состоянии покоя концентрация CuSO<sub>4</sub> была снижена до 0,3 мМ.

Для оценки колониеобразующей способности dormantных клеток *Azospirillum* использовали чашечный метод Коха. Учет результатов проводили после 2-суточной инкубации при 31°C. Для оценки возобновления роста покоящихся бактерий в свежей жидкой среде измеряли оптическую плотность культур при длине волны 595 нм на спектрофотометре Spekol 221 («Carl Zeiss», Германия).

Световую микроскопию использовали в двух случаях – для контроля чистоты культур *Azospirillum*, а также для изучения возможного флокулообразования и кристаллообразования в покоящихся культурах *A. brasilense*, *A. doebereinae*, *A. thiophilum*, *A. fermentarium* и *A. melinis*. Во всех случаях использовали препараты, приготовленные методом раздавленной капли.

При получении покоящихся (dormantных) культур пяти видов рода *Azospirillum* за основу был взят подход, предложенный ранее для *A. brasilense* Sp245 [3, 4]. В случае *A. brasilense* SR80 в опубликованный протокол было внесено изменение (исключена одна процедура) – бактерии перед перенесением в условия жесткого стресса не отмывали, т.е. не удаляли факторы межклеточной коммуникации (таблица 1).

Таблица 1 – Стрессовые факторы, использованные для получения некультивируемых клеток *A. brasilense* Sp245 [3] и SR80

№	Стрессовые факторы	Культуры	Sp245	SR80
1	Замена оптимальной среды на физиологический раствор		+	+
2	Сниженная стартовая плотность культуры, 10 <sup>6</sup> кл./мл		+	+
3	Удаление факторов межклеточной коммуникации		+	–
4	Гексилрезорцин в среде, мМ		0,3	0,3
5	CuSO <sub>4</sub> в среде, мМ		0,4	0,4

Примечание – Знаки «+» и «–» означают использование/неиспользование указанного стрессового фактора.

Использование модифицированного протокола позволило получить культуру *A. brasilense* SR80, содержащую жизнеспособные, но некультивируемые клетки (ЖНК). Бактерии при этом полностью утрачивали способность к размножению на твердой агаризованной среде.

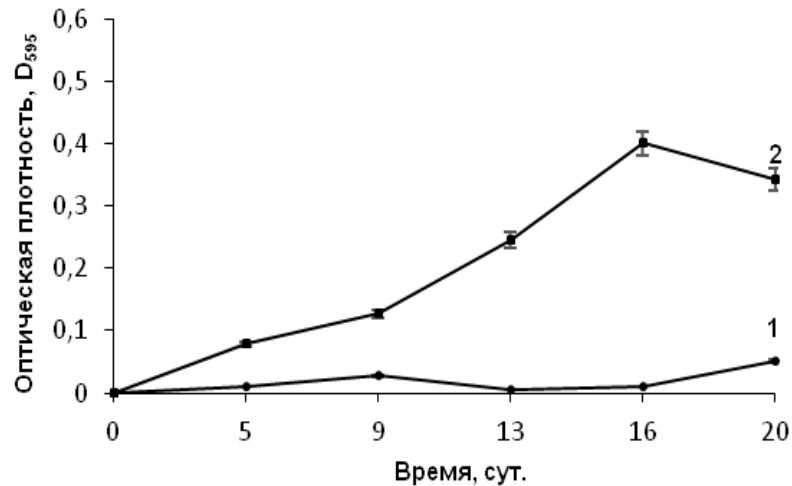
Эксперименты по оценке роста в свежей жидкой среде дали следующие результаты. При небольшом сроке действия стресса (от нескольких дней до нескольких недель) покоящиеся *A. brasilense* SR80 возобновляли размножение в свежей жидкой среде, но только в случае использования оптимального инокулята, то есть когда в свежую среду переносили достаточно большое число дормантных клеток (10% от объема среды). С течением времени, ЖНК штамма SR80 полностью утрачивали способность переходить к делению в свежей среде без внесения индукторов роста.

В первых экспериментах по получению покоящихся клеток *A. doebereinae* комплекс стрессовых факторов был таким же, как и в случае *A. brasilense* SR80 и Sp245 (таблица 1). В результате было выяснено, что стрессоустойчивость *A. doebereinae* GSF71 ниже, чем у штамма SR80 и Sp245

[3, 4]. Ни в одном из проведенных экспериментов не удалось зарегистрировать рост бактерий на твердой и в жидкой среде, что дало нам возможность предположить, что все бактериальные клетки погибали под действием стресса. В связи с этим для *A. doebereinae* GSF71 и *A. thiophilum* VSU BV-S были взяты более мягкие стрессовые условия: концентрация сульфата меди была снижена с 0,4 мМ до 0,3 мМ. Так как сведения о стрессоустойчивости *A. doebereinae* GSF71 и *A. thiophilum* VSU BV-S единичны, покоящиеся культуры каждого из штаммов готовили в двух вариантах: в первом случае в физиологический раствор с добавками 0,3 мМ гексилрезорцина и 0,3 мМ  $\text{CuSO}_4$  вносили 10% инокулята, во втором – 1% (от объема среды). В дальнейшей работе эти два варианта обозначали как ПК-1% и ПК-10% (покоящаяся культура с 1% и 10% инокулята, соответственно).

Проведенные эксперименты показали, что клетки покоящихся культур *A. doebereinae* GSF71 и *A. thiophilum* VSU BV-S утрачивают способность к образованию колоний на твердой агаризованной среде, но размножаются при перенесении в свежую жидкую среду СМС. Колониеобразующую способность дормантных бактерий *A. doebereinae* GSF71 и *A. thiophilum* VSU BV-S проверяли трижды. Было установлено, что независимо от начальной плотности культуры (1 или 10% инокулята) бактерии не образуют колоний на агаризованной синтетической среде ( $\text{KOE} = 0$ ).

Следующим этапом работы было выяснение способности покоящихся бактерий штаммов GSF71 и VSU BV-S переходить к размножению в свежей жидкой среде без дополнительной стимуляции. *A. doebereinae* GSF71 обеих вариантов (ПК-1% и ПК-10%) пересевали в свежую жидкую СМС и наблюдали за ними в течение 20 дней. Как видно из представленных данных (рисунок 1), в случае 10% инокулята бактерии со временем преодолевали стресс и достигали относительно высокой плотности (макс. среднее значение  $D_{595} = 0,4$ ; 16 сут.). При неоптимальной плотности – 1% инокулята, поведение покоящейся культуры было иным. Оптические показатели были низкими (макс. среднее значение  $D_{595} = 0,052$ ; 20 сут.).



1 – культура ПК-1%, 2 – культура ПК-10%

Рисунок 1 – Возобновление роста покоящихся бактерий *Azospirillum doebereinae* GSF71 из культур ПК-1% и ПК-10% в свежей жидкой среде СМС.

Несмотря на кажущуюся «одинаковость» культур ПК-1% и ПК-10% *A. thiophilum* (обе утрачивали колониобразующую способность), их физиологическое состояние было разным, что проявилось в эксперименте по возобновлению роста бактерий в свежей среде. Покоящиеся клетки культуры ПК-1% не переходили к размножению, в то время как бактерии ПК-10% – размножались в свежей СМС. Плотность культуры при этом достигала достаточно высоких значений (0,45; 20 сут.).

Эксперименты такого же типа, как и для трех описанных выше видов *Azospirillum*, были проведены с *A. melinis* ТМСУ 0552 и *A. fermentarium* СС-ЛУ743. Для получения покоящихся культур бактерии помещали в те же стрессовые условия, что и *A. doebereinae* и *A. thiophilum*. Так же, как и в вышеописанных экспериментах, важно было выяснить, зависит ли физиологическое состояние покоящихся культур *A. melinis* и *A. fermentarium* от числа микробных клеток. В связи с этим также было получено два типа культур – ПК-1% и ПК-10%.

После перенесения вегетативных клеток *A. melinis* и *A. fermentarium* в стрессовые условия оценивали оптическую плотность полученных ПК-1% и ПК-10%. В обоих случаях – и при оптимальном и неоптимальном инокуляте, в покоящихся культурах *A. melinis* ТМСУ 0552 и *A. fermentarium* наблюдалось увеличение оптической плотности. Это, в свою очередь, позволяет предположить, что на первых этапах формирования покоящихся культур, происходило увеличение числа клеток [5].

Для того чтобы выяснить, утрачивают ли клетки дормантных культур *A. melinis* ТМСУ 0552 и *A. fermentarium* СС-LY743 колониеобразующую способность, делали высев бактерий на плотную агаризованную среду. Анализировали все культуры: ПК-1% и ПК-10% *A. melinis*, а также ПК-1% и ПК-10% *A. fermentarium*. Анализ проводили дважды; в случае более длительного воздействия стресса во всех случаях колонии на чашках отсутствовали, т.е. КОЕ = 0.

Для более полной характеристики ростового потенциала покоящихся культур делали высевы из ПК-1% и ПК-10% *A. melinis*, а также ПК-1% и ПК-10% *A. fermentarium* в жидкую СМС. За ростом бактерий в свежей среде наблюдали в течение 3 недель (визуально и измеряли оптическую плотность). С течением времени культуры *A. melinis* и *A. fermentarium* становились визуально мутными,  $D_{595}$  к концу наблюдения увеличилась в среднем до 0,1, что позволяло сделать вывод о переходе бактерий к делению.

С использованием одной из полученных покоящихся культур – *A. brasilense* SR80, был проведен комплекс экспериментов по изучению факторов, индуцирующих выход азоспирилл из состояния покоя. В качестве потенциальных индукторов использовали:

- дистиллированную воду;
- культуральную жидкость растущих (вегетативных) бактерий штамма SR80;
- АЗП (лектин, входящий в состав корневых выделений пшеницы).

При тестировании воды в качестве потенциального индуктора анализировали три варианта: разведение культуры *A. brasilense* SR80 водой в соотно-



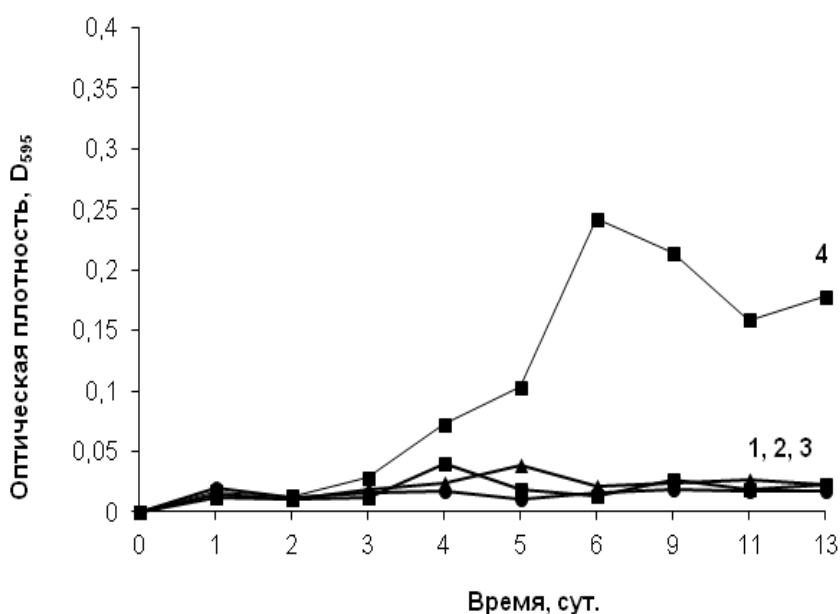
шении 1:1, 1:20 и 1:40. Было установлено, что у *A. brasilense* SR80, в отличие от некоторых других бактерий [6], использование дистиллированной воды для стимуляции выхода из покоя не дает стабильного и выраженного эффекта.

При использовании культуральной жидкости для индукции выхода бактерий из покоя эксперимент проводили следующим образом: в свежую жидкую среду СМС вносили аликвоту покоящейся культуры *A. brasilense* SR80 – в объеме 10% от объема среды. При этом к контрольной культуре ничего не добавляли, а в опытные варианты вносили культуральную жидкость *A. brasilense* SR80 экспоненциальной фазы роста (18 часов роста). Анализировали действие индуктора в зависимости от его концентрации: культуральную жидкость вносили в объеме 1; 5 или 10% от объема среды. Рост-активирующее действие оценивали по оптической плотности бактерий при их росте в свежей среде. Кроме того, из колб делали высев на чашки, чтобы выявить возможное восстановление жизнеспособности покоящихся клеток факторами роста.

Факт отсутствия бактериального роста в контрольной культуре подтвердился с использованием двух подходов: значения оптической плотности контрольной культуры были равны 0; высев на твердую среду в возрасте 24 дня также дал отрицательные результаты. Противоположные результаты были получены в опытных вариантах. Проведенные анализы показали, что в варианте «1% культуральной жидкости» эффект был менее выражен, чем в двух других случаях. Культуры двух других вариантов (5% и 10% культуральной жидкости) были визуально мутными, что хорошо согласовывалось со значениями оптической плотности. Число жизнеспособных клеток также было высоким – не менее 1 млн. клеток в 1 мл культуры штамма SR80.

В следующем эксперименте оценивали способность лектина пшеницы – АЗП стимулировать переход покоящихся азоспирилл *A. brasilense* SR80 к размножению в свежей жидкой среде. В контрольном варианте среда не содержала лектина, в трех других – АЗП вносили вместе с инокулятом до

конечной концентрации 10 нг/мл, 100 нг/мл или 1 мкг/мл. Рост азоспирилл оценивали по увеличению оптической плотности культуры. Как видно из представленных данных (рисунок 2), в первые 2 недели наблюдения не удавалось выявить бактериального роста в контроле и в двух вариантах с лектином – при концентрациях АЗП 10 и 100 нг/мл. В случае более высокого содержания лектина – 1 мг/мл, на 4-е сутки азоспириллы переходили к размножению, причем с течением времени показатель  $D_{595}$  в этом варианте увеличивался.



1 – контроль (без АЗП); 2 – АЗП, 10 нг/мл; 3 – АЗП, 100 нг/мл;  
4 – АЗП, 1 мкг/мл.

Рисунок 2 – Влияние агглютинина зародышей пшеницы на рост покоящихся бактерий *A. brasilense* SR80 в свежей жидкой среде.

Что касается азоспирилл, растущих в присутствии 10 и 100 нг/мл АЗП в среде, вплоть до возраста 20 дней бактериального роста не наблюдалось. Тем не менее, спустя месяц эти культуры вышли из состояния покоя – рост наблюдался визуально и оптическая плотность существенно возросла.

При использовании современной световой микроскопии в покоящихся культурах изученных штаммов 5 видов рода *Azospirillum* были обнаружены флоккулы, значительно варьирующие по размерам (рисунок 3). В ряде культур

встречались флоккулы двух типов. В первом случае они состояли преимущественно из матрикса, в то время как число покоящихся клеток было невелико. Флоккулы второго типа состояли, главным образом, из плотно прилегающих друг к другу покоящихся клеток. Культуры разных видов рода *Azospirillum* различались между собой как по количеству свободных клеток, так и по их размерам.



Рисунок 3 – Световая микроскопия дормантной культуры *A. thioophilum* VSU BV-S. Размеры крупной флоккулы 27×54 мкм.

В покоящихся культурах *A. brasilense* SR80 и других видов помимо флоккул обнаруживались также и кристаллы. Идентификация кристаллов в данной работе проводили с использованием классического подхода – сравнивая изображения объекта в обычной режиме и в режиме поляризации. Химическая природа кристаллов остается неизвестной.

#### **Выводы:**

1. С использованием комплекса стрессовых факторов получены покоящиеся культуры представителей пяти видов рода *Azospirillum* – *A. brasilense* SR80, *A. doebereinae* GSF71, *A. thioophilum* VSU BV-S, *A. fermentarium* CC-LY743 и *A. melinis* TMCY 0552.

2. Установлено, что в покоящихся культурах бактерии полностью утрачивают колониобразующую способность, но при этом сохраняют способность возобновлять рост в свежей жидкой среде при оптимальном инокуляте.

3. Выявлены два индуктора выхода бактерий *A. brasilense* SR80 из состояния покоя: культуральная жидкость вегетативной культуры того же штамма и агглютинин зародышей пшеницы.

4. В покоящихся культурах *A. brasilense* SR80, *A. doebereineriae* GSF71, *A. thiophilum* VSU BV-S, *A. fermentarium* CC-LY743 и *A. melinis* TMCY 0552 выявлено присутствие флокул и кристаллов.

#### **Список использованных источников**

1. Cassán, F. D. Handbook for *Azospirillum* / Eds. F. D Cassán, Y. Okon, C. M. Creus. Switzerland: Springer International Publishing, 2015. 501 p.

2. Механизмы выживания бактерий / О. В. Бухарин [и др.]. М.: Медицина, 2005. 367 с.

3. Ханадеева, М. А. Анализ биотехнологического потенциала бактерий *Azospirillum brasilense* – природных симбионтов пшеницы, с учетом их взаимодействия с лектином растения-хозяина: дис. ... канд. биол. наук / М. А. Ханадеева. Саратов, 2015. 223 с.

4. Факторы, индуцирующие переход ризобактерий *Azospirillum brasilense* от размножения к покою / М. А. Кушнерук [и др.] // Микробиология. 2013. Т. 82, № 5. С. 563–570.

5. Мулюкин, А. Л. Покоящиеся формы неспорообразующих бактерии: свойства, разнообразие, диагностика: дис. ... д-ра биол. наук / А. Л. Мулюкин. Москва, 2010. 349 с.

6. Реактивация покоящихся и некультивируемых форм бактерий из древних почв и мерзлых подпочвенных отложений / Н. А. Кряжевских [и др.] // Микробиология. 2012. Т. 81, № 4. С. 474–485.