

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

**ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРИАЛЬНОЙ
МИКРОФЛОРЫ СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК
ARABIDOPSIS THALIANA (HEYNH.)**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

студента 2 курса 241 группы
направления 06.04.01 - Биология
биологического факультета
Соколова Александра Олеговича

Научный руководитель

к.б.н., доцент



22.06.2017

Галицкая А.А.

Заведующий кафедрой биохимии и биофизики

д.б.н., профессор



22.06.2017

Коннова С.А.

Саратов 2017

Введение

Суспензионные культуры клеток растений – это группа недифференцированных клеток, выращиваемых на определенных средах, оптимизированных под конкретное растение. Такие системы являются очень удобной моделью для изучения процессов взаимодействий на клеточном уровне.

Практическим результатом таких исследований является знание физиологии и биохимии культивируемых суспензий, например, при клональном размножении хозяйственно значимых растений.

Основными проблемами, с которыми сталкиваются исследователи при поддержании клеточных культур, являются соблюдение условий культивирования, а также обеспечение чистоты культуры при пересадках, защита от посторонних загрязнителей.

Возможность изучения сосуществования растений и микроорганизмов является еще одним значимым аспектом изучения особенностей культивирования клеточных суспензий. Проблема взаимодействия и взаимоотношений макро- и микропартнеров в этом случае заключается в том, что микроорганизмы не обязательно приводят к угнетению растительных культур. Напротив, в литературе часто отмечают случаи латентного сосуществования без всяких видимых нарушений. Тем не менее, наличие бактериальных или иных контаминаций затрудняет работу с культурами растительных клеток, в том числе при анализе результатов экспериментальной работы.

Цель работы – проверка суспензионной культуры клеток *Arabidopsis thaliana* (Heunh.) на бактериальное присутствие с последующей идентификацией выявленных бактерий.

Для реализации поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Проверить суспензионную культуру клеток *A. thaliana* на наличие бактериальной микрофлоры.

2. Провести идентификацию выделенной микрофлоры по результатам секвенирования 16S рРНК.

3. Провести изучение выявленной микрофлоры с использованием основных микробиологических и микроскопических методов, подобрать питательную среду для культивирования.

4. При помощи иммунохимических методов подтвердить соответствие полученного изолята и идентифицированных бактерий.

Научная новизна и научная значимость работы: впервые из суспензионной культуры клеток *Arabidopsis thaliana* (Heynh.) выделены и идентифицированы бактерии, длительное время латентно сосуществующие с растительными клетками. Выявление и характеристика подобных бактериальных контаминаций позволит изучить особенности их взаимодействия с растительными клетками *in vitro*, что обеспечит возможность более точно управлять режимами создания и поддержания растительных культур.

Положения, выносимые на защиту:

1. В суспензионной культуре растительных клеток *A. thaliana* присутствует непатогенная бактериальная микрофлора, появление которой напрямую не связано с нарушением условий поддержания культуры.

2. Грамположительные бактерии со средним размером 1мкм, не обладающие кислотоустойчивостью, принадлежат виду *Rothia amarae*.

Основное содержание работы

Работа состоит из 5 частей: введения, основной части, заключения, выводов и списка использованных источников. Основная часть включает обзор современной научной литературы по теме исследования, который состоит из следующих разделов:

- Общая характеристика суспензионных культур клеток растений
- Источники загрязнения культур растительных клеток
- Методы обнаружения бактериальных контаминаций

- Идентификация бактерий и характеристика
- Выявление бактериальных контаминаций в культурах клеток различных растений
- Способы борьбы с бактериальными контаминациями
- Разные уровни взаимодействия бактерий и растений
- Идентификация микроорганизмов методом ПЦР
- Принцип ПЦР
- Иммунохимические методы выявления бактерий в суспензионной культуре.

Далее в разделе Материалы и методы описаны основные объекты и методы, использованные в работе:

- Объект исследования
- Состав и приготовление питательных сред
- Микробиологические методы окрашивания бактерий
- Микроскопические исследования
- Выделение бактерий
- Определение размеров клеток при помощи малоуглового светорассеяния
- Идентификация бактерий по 16S рРНК
- Иммунохимические методы исследования бактерий

При обычном поддержании суспензионной культуры клеток *A. thaliana* пересадка происходит каждые 10 дней. При этом в культуре не выявляется никаких визуальных признаков бактериальных или иных загрязнений. Однако при более длительном культивировании (20 и более суток) или при нарушении условий выращивания среда загущается, мутнеет и в надосадочной жидкости появляется взвесь. Это позволило предположить, что поддерживаемой культуре может сопутствовать бактериальная микрофлора.

Для первоначальной проверки этого предположения использовали конфокальную микроскопию, поскольку она позволяет получать тонкие

оптические срезы высокого разрешения и проводить объемную реконструкцию полученных изображений.

Было показано, что растительные клетки имеют вытянутую форму и размер порядка 10-40 мкм. В поле зрения так же присутствовали более мелкие частицы размером около 1 мкм. В старой культуре на стадии деградации и уменьшения объема цитоплазмы между клеточной стенкой и плазмалеммой в стадии плазмолиза наблюдается активное движение этих частиц. Подобная подвижность не характерна для клеток растений или их органелл.

Последующее окрашивание этидий-бромидом позволило выявить наряду с клетками арабидопсиса, нуклеиновые структуры, которые не принадлежали к растительным клеткам. При микроскопических наблюдениях можно увидеть наряду с растительными клетками, образования круглой формы диаметром около 1 мкм.

Для проверки бактериального присутствия мы использовали несколько микробиологических методик окрашивания. Окрашивание по Пешкову позволило выявить наличие спор. Окраска по Граму позволила охарактеризовать бактерии, которые обнаружены в культуре клеток арабидопсиса, как грамположительные.

Следующим этапом работы был подбор питательных сред для возможного культивирования выявленных бактерий. Из литературы следует, что одной из наиболее часто используемых сред для выявления бактерий является среда 523. Это богатая среда, которую мы использовали для накопления бактериальной массы.

Культивирование проводили в тех же условиях, что и для суспензии растительных клеток, дублировали культивированием при отсутствии перемешивания.

Исходя из того, что выявленные микроорганизмы растут вместе с растительной культурой, мы использовали в качестве питательной среды стерильный экстракт культуры *A. thaliana*, чистый капустный отвар и среду SH на основе капустного отвара.

Культивирование продолжали в течение месяца, однако накопить бактериальную культуру не удалось.

Бактериальный рост был выявлен лишь при выращивании суспензии клеток *A. thaliana*, без перемешивания и пересадок в течение 20-и и более суток (стрессовые условия) и последующем высеве на жидкую среду 523. Через 30 суток культивирования мы наблюдали визуальные признаки бактериального роста (помутнение среды). Полученный материал был взят для исследования с помощью просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ), т.к. ее разрешение дает возможность четко увидеть размеры исследуемого нами объекта. Нами было обнаружено присутствие бактерий, большая часть из которых, находилась в виде спор размером 1 мкм с узким разбросом по размеру.

Поскольку большинство использованных нами питательных сред имели рН в кислой области, мы провели определение кислотоустойчивости бактерий, проведя окрашивание по Цилю-Нильсену. В результате было обнаружено, что бактерии не обладают устойчивостью к кислым средам, что подтверждается появлением синего окрашивания. Эти данные позволят нам корректировать выбор сред в дальнейшем, поскольку еще предстоит работа по накоплению выявленных бактерий и их дальнейшей идентификации.

На следующем этапе данной работы из 10-ти суточной культуры арабидопсиса методом дробного центрифугирования было проведено количественное выделение бактериальных клеток. Полученный материал был взят для изучения при помощи малоуглового светорассеяния на приборе Zetasizer Nano ZS. С помощью данного метода было обнаружено, что 80,7 % от всех частиц, находящихся в кювете с исследуемым материалом составляют частицы размером 1130 нм, 11,4 % – частицы 150 нм и 7,9 % – частицы 5560 нм. Это хорошо сочетается с полученными ранее данными о размере спор, выявленных в суспензионной культуре арабидопсиса методом электронной микроскопии. Таким образом, нам удалось провести предварительное накопление бактерий. Для подтверждения этого полученный образец также

проанализировали с помощью просвечивающей электронной микроскопии. На фотографиях, полученных при помощи ПЭМ, в поле зрения присутствуют от 1 до 3 бактерий, имеющих размер примерно 1 мкм.

Для дальнейшей работы проводили идентификацию выделенных бактерий по 16S рНК. Материал брали из 10-и дневной культуры, фильтровали и дважды центрифугировали при разных условиях. Полученный образец был отправлен во Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии (НПК Синтол) для проведения идентификации. Анализ проводили при помощи метода полимеразой цепной реакции (ПЦР) по 16S рНК. Для этого использовали набор универсальных праймеров. С идентичностью 99.46 % по 16S рНК, полученный нами изолят соответствует виду *Rothia amarae*. Штаммом для сравнения служил штамм J18, который по данным GenBank'a являлся типовым для данного вида. В результате была получена последовательность нуклеиновых кислот.

Полученную последовательность анализировали в GenBank. В результате, таксономическое окружение полученной последовательности в тесте 16S рНК имело 11 совпадений последовательностей с попарной идентичностью > 96 % – межвидовой и внутривидовой уровень по Kim et al.

Ближайший родственник данного штамма – *Rothia amarae* J18, GenBank NR_029045.1, score 1925. После этого провели множественное выравнивание последовательностей (МВП) 16S рНК, полученного материала.

Имеющуюся последовательность 16S рНК сравнили с другими штаммами *Rothia amarae* и также местами их выявления. Результаты представлены в таблице 1.

Таким образом, наблюдается широкое разнообразие мест обитания представителей этого вида. По 17 записям в GenBank'e среды обитания включают: бактериальное разнообразие юга Индийского океана, сточные воды, бобовые растения, меристемы банана, морской зоопланктон, горные пробы восточной Антарктики, осадок озера Хевиз (Венгрия).

Для более общего анализа была построена кладограмма, выполненная с помощью попарного сравнения идентичности последовательностей 16S рРНК, выявляет принадлежность штаммов *R. amarae* и полученного изолята к монофилетической группе видов рода *Rothia* с высокой степенью вероятности > 96 %. Это соответствует внутривидовому уровню идентичности.

Анализ ближайшего таксономического окружения, выделенного нами изолята, в тесте 16S рРНК при попарной идентичности последовательностей > 96 % демонстрирует дополнительную нишу обитания этих видов. Был выявлен ряд представителей, которые были выделены из почвы в Тайване, дрозофил, мышей, вод морей.

После проведенной идентификации, а также из работы Y. Fan стало известно, что подходящей средой для культивирования ротии является кровяной агар, который широко используется для культивирования патогенных бактерий, а также подходит и для *Rothia amarae*.

Для приготовления среды брали основу кровяного агара 3,6 г/100 мл и добавляли цельную кровь человека в два этапа: перед автоклавированием 5 мл; и после 5 мл. Затем среду разливали в чашки Петри.

При попытке высеять бактерии на кровяной агар непосредственно из культуры арабидопсиса положительных результатов не было. Тогда был применен метод выделения бактерий из растительной суспензионной культуры фильтрацией с дальнейшим центрифугированием. Полученный материал был посеян петлей на кровяной агар и помещен в термостат с температурой, необходимой для культивирования клеток растений ($25\pm 1^\circ\text{C}$), а также в условия указанные в литературе ($30\pm 2^\circ\text{C}$). Положительный результат – рост бактерий наблюдали в обоих случаях.

Материал с чашек Петри был перенесен в пробирки для дальнейшего изучения с помощью просвечивающей электронной микроскопии. По результатам электронной микроскопии, бактерии оказались морфологически похожими бактериям, полученным непосредственно из культивируемых клеток арабидопсиса. Хотя заметна некоторая разница в электронной плотности

поверхности бактерий. Сохраняется примерный размер бактерий (около 1 микрона) и их агрегация в виде диад и тетрад. Полученные нами данные хорошо согласуются с литературными данными, в которых ротии описаны, как «грамположительные, округлой формы, образуют диады и тетрады, колонии молочного цвета, слизевидные, с гладкой выпуклой поверхностью».

Помимо этого, показана возможность культивирования выделенных бактерий вне растительной суспензионной культуры на кровяном агаре в чашках Петри.

Для последующего изучения локализации этих бактерий в системе «культивируемая *in vitro* клетка растения – бактерия», необходимо было получить специфические антитела к ним. Поэтому следующим этапом было проведение иммунизации кроликов, для получения антител на бактерии *Rothia amarae*.

Материал для иммунизации готовили при помощи дробного центрифугирования из 10-15-и дневной культуры арабидопсиса, как описано в материалах и методах. Пред иммунизацией проводили очистку образцов от формалина. Отмытую от формалина суспензию фиксированных клеток использовали для иммунизации кроликов.

Иммунизацию проводили с полным адьювантом Фрейнда в 3 этапа.

Через неделю после последней иммунизации из ушной раковины отбирали кровь (примерно 25 мл). После ретракции сгустка, полученную сыворотку разбавляли в два раза холодной водой и высаливали 100%-м сульфатом аммония до конечной концентрации 50 %.

Проводили проверку полученных антител. Для этого отбирали аликвоту осадка антител, осаждали 5 мин при 2000g и осадок ресуспензировали PBS.

Для анализа брали, как фиксированных бактерий, которыми использовали для иммунизации, а также бактерии, выросшие на кровяном агаре. Пред нанесением на нитроцеллюлозную бумагу производили последовательные двойные разведения бактерий в PBS, рассчитанные на 6 точек. На нитроцеллюлозную бумагу наносили по 2 мкл образца. Высушивали,

помещали в блокирующий буфер (2 % раствор сухого обезжиренного молока) на 15 минут. После блокирующего буфера помещали в PBS для отмывки. Затем помещали в раствор с антителами и инкубировали 1 час при $37\pm 2^\circ\text{C}$. По завершении инкубации помещали в PBS для очистки от не связавшихся антител. Затем помещали в раствор, позволяющий проявить, произошло ли связывание бактерий и антител или нет. Для этого использовали Понсо-С – для проверки прикрепления бактерий к мембране и антиколически антитела-коллоидное золото (КЗ - 20нм). Связывание бактерий с мембраной прошло только у нефиксированных бактерий. При этом хорошо видно уменьшение интенсивности окраски по мере уменьшения концентрации бактерий.

Было показано, что антитела способны связаться с бактериями, выросшими на кровяном агаре, а фиксированные формалином бактерии имели менее выраженную окраску. Учитывая, что посадка фиксированных формалином бактерий на мембрану была минимальной, тем не менее, можно наблюдать взаимодействие антител и в этом случае. Это свидетельствует о возможности взаимодействия антител и с таким антигеном. Однако следует подобрать мембрану, обеспечивающую хорошую адгезию фиксированных клеток бактерий к ней.

Таким образом, в результате проведенных экспериментов, показано, что бактерии, выросшие на кровяном агаре и полученные непосредственно из живой суспензионной культуры клеток арабидопсиса, являются одной и той же бактерией - *Rothia amarae*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Суспензионные культуры клеток растений подразумеваются свободными от микробиологических загрязнений. Но на практике многие исследователи отмечают присутствие или появление микробиологических примесей. Иногда такое бактериальное загрязнение носит латентный характер и не является патологическим. Часто такого типа загрязнения могут не проявляться при

обычных условиях культивирования, но в случае нарушения режима культивирования или в каких-то стрессовых условиях проявляют себя.

Объектом исследования в данной работе служила суспензионная культура *Arabidopsis thaliana* (Heynh.) Col-0 (экотип Columbia), в которой были выявлены пока еще не идентифицированные бактериальные клетки.

Микро- и макровзаимодействия между *A. thaliana* и контаминантами, населяющими межклеточное пространство, вызывает интерес. Воздействие этих организмов на растительную культуру клеток может и не наблюдаться визуально, однако при проращивании может произойти угнетение роста или вымирание всей культуры.

По результатам анализа последовательности ДНК гена 16S рРНК показано, что присутствующие бактерии наиболее близки к виду *Rothia amarae*. Так же это косвенно подтверждается совпадением описания КОЕ ротии в литературе и колоний, полученных на кровяном агаре в результате выполнения данной работы. Проведенная иммунизация позволила получить антитела при помощи, которых провели дот анализ. Он показал, что бактерии, которыми проводили иммунизацию и бактерии, выросшие на кровяном агаре являются *Rothia amarae*.

Целью дальнейшей работы будет использование иммунохимических и других методов для изучения локализации бактерий *Rothia amarae* в культивируемых клетках *Arabidopsis thaliana*, характеристике полученного изолята, а также изучению процессов взаимодействия партнеров.

ВЫВОДЫ

1. Впервые показано присутствие в суспензионной культуре растительных клеток *A. thaliana* непатогенной бактериальной микрофлоры. Из среды культивирования *A. thaliana* выделены бактерии со средним размером 1 мкм, не обладающие кислотоустойчивостью и являющиеся грамположительными. Бактерии представлены, возможно, споровой формой.

2. По результатам секвенирования 16S рРНК показано, что данная бактерия принадлежит к виду *Rothia amarae*.

3. Подобрана микробиологическая среда, позволившая выращивать выделенные бактерии *in vitro*. Предварительный морфологический анализ колоний полученного изолята совпадает с описанием колоний типового штамма *R. amarae* J18.

4. При помощи полученных поликлональных кроличьих антител подтверждено соответствие полученного изолята и бактерий, выделенных из суспензионной культуры клеток арабидопсиса.