

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  
УНЦ физико-химической биологии  
СГУ и ИБФРМ РАН

**ИК-ФУРЬЕ-СПЕКТРОСКОПИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ НАКОПЛЕНИЯ  
ПОЛИ-3-ГИДРОКСИБУТИРАТА ШТАММОМ *AZOSPIRILLUM  
BRASILENSE* SP7 ПРИ РАЗЛИЧНОМ СОДЕРЖАНИИ ХЛОРИДА  
АММОНИЯ И ВРЕМЕНИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

студентки 4 курса 421 группы  
направление подготовки 06.03.01 - Биология  
Биологического факультета  
Паршиной Викторией Валерьевны

Научный руководитель:

д.б.н., профессор



С.А. Коннова

(подпись, дата)

20.05.2018

Научный консультант:

канд. биол. наук, с.н.с.

ЛБ ИБФРМ РАН



А.В. Тугарова

(подпись, дата)

Заведующий кафедрой

д.б.н., профессор



С.А. Коннова

(подпись, дата)

20.05.2018

Саратов 2018

## ВВЕДЕНИЕ

Многие микроорганизмы способны к синтезу полигидроксиалканоатов (ПГА) в ответ на неблагоприятные условия окружающей среды. Они накапливаются внутри бактериальных клеток в виде гранул и позволяют бактериям лучше противостоять негативным внешним условиям, а также являются источниками углерода и энергии.

Синтезировать ПГА могут и различные ризосферные бактерии. Они широко используются в сельскохозяйственной биотехнологии в качестве бактериальных удобрений.

Бактерии вида *Azospirillum brasilense* представляют собой, грам-отрицательные ризосферные бактерии, способные образовывать ассоциации с корнями многих растений и синтезировать поли-3-гидроксибутират (ПГБ) (самый изученный пластик из класса ПГА). Для работы был выбран один из наиболее изученных штаммов: *A. brasilense* Sp7. В качестве сравнения был взят штамм *A. brasilense* Sp245. Штамм *A. brasilense* Sp245 является эндофитом, Sp7 – эпифитом.

ПГА также являются одними из наиболее перспективных для замены традиционных пластиков из нефтепродуктов, т.к. обладают рядом преимуществ: быстро деградируют в окружающей среде, их физические свойства схожи с синтетическими пластиками, они обладают физической вариабельностью.

Целью работы был подбор условий культивирования, при которых бактерии *Azospirillum brasilense* синтезируют максимальное количество ПГБ при минимальном времени роста культуры.

Для реализации цели были поставлены и решены следующие задачи:

1. Мониторинг методом ИК-фурье-спектроскопии накопления ПГБ бактериями *A. brasilense* Sp7 в сравнении с *A. brasilense* Sp245 при культивировании на средах с различными концентрациями  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (лимитирующего фактора).

2. Определение оптимального времени культивирования штаммов *A. brasilense* Sp7 и Sp245, при котором наблюдается синтез максимального количества ПГБ.

3. Выделение ПГБ из бактериальной массы штамма *A. brasilense* Sp7, культивируемого в условиях, при которых наблюдается наиболее активный синтез ПГБ (концентрация хлорида аммония и времени культивирования).

Для реализации поставленных задач были выполнены следующие действия:

В ходе работы на всех этапах эксперимента бактерии штаммов *A. brasilense* Sp7 и Sp245 были выращены на модифицированной синтетической малатной среде (СМС), предложенной Дей и Доберейнер [1]. Посевной материал для всех экспериментов выращивали аэробно в колбах объемом 250 мл, содержащих по 100 мл СМС с добавлением 0,5 г/л  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , в течение 18–22 ч.

Для мониторинга синтеза ПГБ бактерии *A. brasilense* Sp245 и Sp7 выращивали на среде СМС в аэробных условиях с добавлением 0,05, 0,10 и 0,21 г/л  $\text{NH}_4\text{Cl}$  в течение 6 сут. Мониторинг синтеза ПГБ осуществлялся методом ИК-фурье-спектроскопии (ИКФС) *in situ*. Отбор клеточного материала для ИКФС-анализа происходил на 1-3 и 6 сут выращивания. На основании анализа измеренных ИК-фурье-спектров рассчитывалась величина  $\alpha$ . По итогам экспериментов были выбраны штамм, время и условия культивирования. После была проведена экстракция ПГБ и подсчет его процентной концентрации относительно сухой клеточной массы.

Работа включает в себя следующие разделы: обозначения и сокращения, основная часть, заключение, выводы, список использованных источников. Основная часть включает в себя следующие главы: обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В ходе эксперимента бактерии *A. brasilense* Sp7 и Sp245 выращивались в условиях трофического стресса, вызванного нехваткой азота. В исследованиях для решения поставленной цели были выбраны концентрации  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,05, 0,1 и 0,21 г/л.

Динамику накопления ПГБ клетками *A. brasilense* Sp7 и Sp245 при различной концентрации хлорида аммония отслеживали в течение 6 суток. Для оценки относительного содержания ПГБ в бактериальной биомассе был использован метод ИКФС.

В основе метода ИКФС лежит регистрация колебаний функциональных групп атомов в молекулах под действием ИК-излучения. Спектры колебания групп возникают вследствие поглощения веществом излучения, вызывающего электрическое изменение дипольного момента молекулы. ИК-спектры бактериальных клеток являются специфичными, что позволяет определять в клетке наличие всех типов молекул, в том числе и включения ПГБ.

Накопление ПГА в бактериальной биомассе определяют по характерным для этих полиэфиров полосам, в первую очередь по наиболее интенсивной полосе валентных колебаний карбонильной группы сложноэфирного фрагмента (в области  $1720\text{--}1750\text{ см}^{-1}$ ). Данная полоса использовалась нами в работе как маркер ПГБ. Такая же связь характерна и для липидов, однако, учитывая, что их общее содержание в клетке составляет менее 10%, вклад, вносимый ими в измеряемый спектр, не существенен и в экспериментах им можно пренебречь.

Известно, что в бактериальной клетке содержание белка составляет порядка 40–60% и для определенных бактерий в сходных условиях изменяется несущественно [2], что в ИК-спектроскопии позволяет использовать интенсивности характеристических полос клеточных белков амид-I (в области  $1620\text{--}1680\text{ см}^{-1}$ ) или амид-II (около  $1550\text{ см}^{-1}$ ) как внутренний стандарт [2,3].

На рисунке 1 представлен один из измеренных ИК-фурье-спектров: бактериальной культуры *A. brasilense* Sp7, выращенной в течение 3 сут в присутствии 0,10 г/л  $\text{NH}_4\text{Cl}$ .

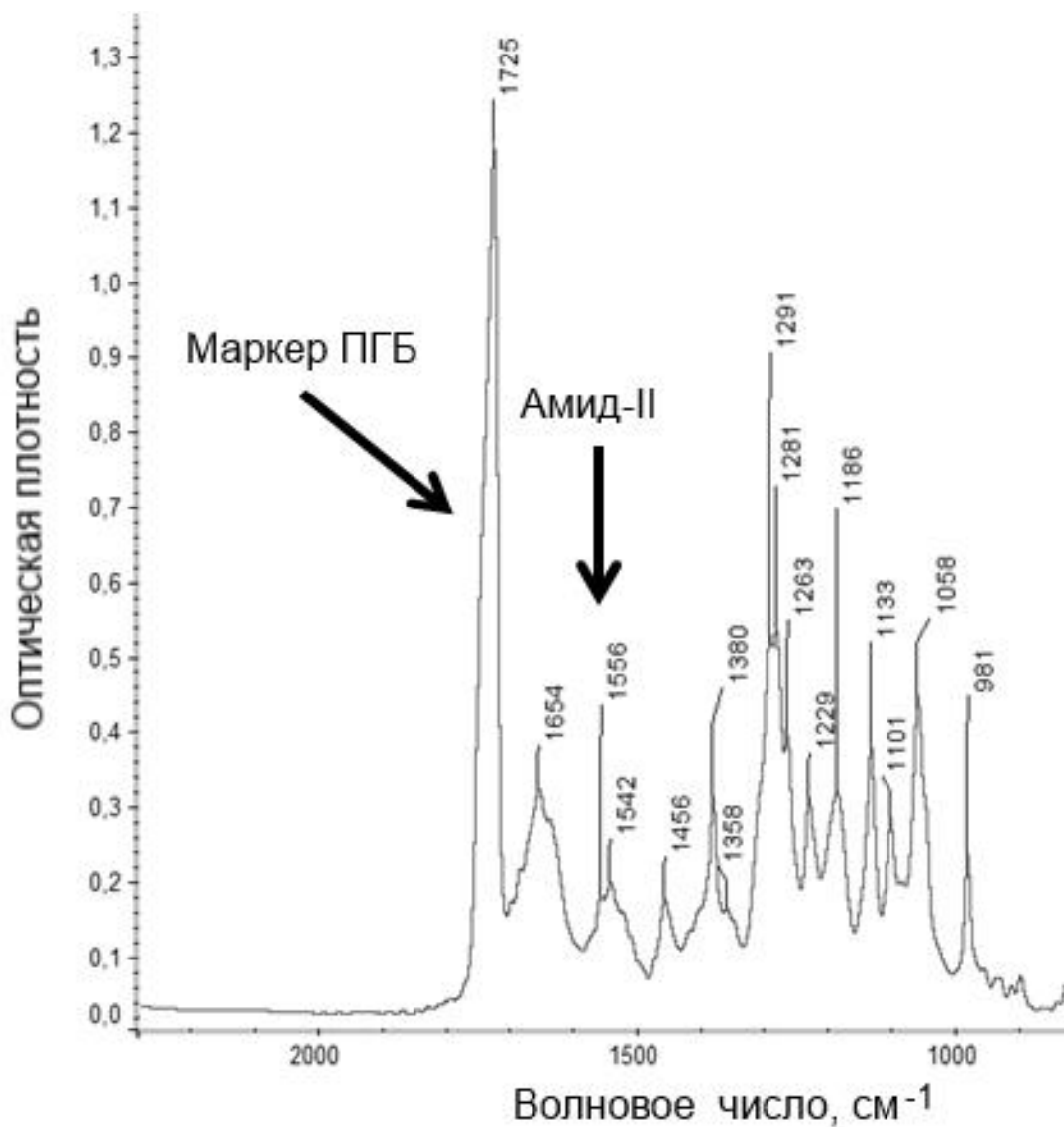


Рисунок 1 – ИК-фурье-спектр высушенной биомассы штамма *A. brasilense* Sr7, выращенного в течение 3 сут в присутствии 0,1 г/л NH<sub>4</sub>Cl.

На основании анализа данных спектров рассчитывалась величина  $\alpha$  [2], представляющая собой соотношение полосы – маркера ПГБ к интенсивности полосы амид-II.

В таблице 1 представлены рассчитанные соотношения ( $\alpha$ ) для измеренных спектров исследуемых образцов обоих штаммов. С первого дня культивирования штаммы показали различную степень отклика на дефицит хлорида аммония. Однако динамика накопления ПГБ на протяжении всего времени культивирования была одинаковой для обоих штаммов.

Таблица 1 – Соотношение интенсивностей  $\alpha$  полос ПГБ (около 1730 см<sup>-1</sup>) и амид-II (около 1550 см<sup>-1</sup>) в ИК-фурье-спектрах биомассы бактерий при накоплении поли-3-гидроксибутирата (ПГБ) штаммами *A. brasilense* Sp7 и Sp245

| Время,<br>сут | Концентрация NH <sub>4</sub> Cl в среде выращивания, г/л |       |             |       |      |       |
|---------------|--|-------|-------------|-------|------|-------|
|               | 0,05   |       | 0,10        |       | 0,21 |       |
|               | Sp7  | Sp245 | Sp7         | Sp245 | Sp7  | Sp245 |
| 1             | 4,94   | 0,59  | 3,09        | 0,46  | 2,07 | 0,33  |
| 2             | 4,59   | 0,94  | 7,05        | 0,61  | 4,99 | 0,57  |
| 3             | 4,7  | 0,96  | <b>8,46</b> | 1,06  | 4,39 | 0,97  |
| 6             | 2,62   | 1,02  | 5,08        | 0,4   | 2,94 | 0,66  |

Как видно из представленных данных, величины  $\alpha$  для штамма *A. brasilense* Sp245 во всех случаях значительно (в ~2,5–8 раз) ниже, чем для штамма Sp7. Это отражает существенно меньшее накопление ПГБ штаммом Sp245 в аналогичных условиях и, вероятно, связано с более выраженным клеточным ответом штамма Sp7 на неблагоприятные условия (в присутствии малых концентраций связанного азота в среде) [3]. Значение  $\alpha$  максимально для штамма *A. brasilense* Sp7 при выращивании в течение 3 сут при исходном содержании NH<sub>4</sub>Cl 0,10 г/л. Снижение величины  $\alpha$ , отражающее снижение относительного содержания ПГБ, отчетливо проявляющееся на 6-е сут культивирования, соответствует переходу бактерий на использование внутренних резервов (ПГБ) при исчерпании питательных веществ среды.

Однако необходимо отметить, что форма полосы валентных колебаний карбонильной группы сложноэфирного фрагмента в области 1720–1750 см<sup>-1</sup> для измеренных нами спектров заметно отличалась для разных образцов, что отражает различное соотношение упорядоченной (с большей степенью кристалличности) и неупорядоченной (более аморфной) структур ПГБ, имеющих различающиеся частоты колебаний [4]. Данное обстоятельство может снижать точность определения относительного содержания ПГБ по используемому в данной работе методу расчета соотношения  $\alpha$  (по отношению интенсивностей полос). Тем не менее, сравнение значений  $\alpha$  для биомасс, выращенных и изученных в сходных условиях, позволяет оценить различия в уровне накопления ПГБ клетками бактерий.

Далее был выделен ПГБ из клеток *A. brasilense* Sp7, выращенных в условиях, для которых значение  $\alpha$  было максимальным: 3 сут при содержании NH<sub>4</sub>Cl 0,10 г/л, с последующей экстракцией ПГБ из высушенной биомассы хлороформом. Содержание ПГБ составило 37% от общей сухой биомассы.

На основании проведенных экспериментальных исследований и расчетов показано, что при субоптимальных исходных концентрациях связанного азота в среде (0,05–0,21 г/л NH<sub>4</sub>Cl) накопление ПГБ штаммом *A. brasilense* Sp7 в течение 1–6 сут культивирования происходит более интенсивно, чем штаммом Sp245. Максимальное количество ПГБ накапливается штаммом *A. brasilense* Sp7 при исходной концентрации хлорида аммония в среде 0,10 г/л после 3 сут культивирования и составляет 37% от сухой биомассы.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время активно ведется изучение бактерий *A. brasilense* и их позитивное влияние на растения. В основном, исследования касаются свойств, важных для колонизации растения и реализации ростстимулирующего потенциала азоспирилл [5,6,7].

На сегодняшний день, биопрепаратов на основе штаммов рода *Azospirillum* мало и использование их ограничено. Причиной этого является нестабильность результатов инокуляции, связанная, в том числе и с выживанием азоспирилл как при внесении в ризосферу, так и при длительном хранении. Поэтому при разработке новых коммерческих форм предпочтение часто отдается представителям других родов, например *Bacillus*, в том числе из-за способности последних к спорообразованию, что позволяет создавать биопрепараты с длительным сроком хранения.

Одной из стратегий выживания у азоспирилл является накопление ПГБ. Штаммы, накапливающие его в достаточном количестве, более конкурентоспособны в ризосфере. В нашей работе был проведен подбор условий культивирования, при которых бактерии *A. brasilense* накапливают максимальное количество ПГБ при минимальном времени роста. Анализировалось накопление ПГБ штаммом *A. brasilense* Sp7 по сравнению со штаммом *A. brasilense* Sp245. Последний является эндофитом, способным к колонизации внутренних тканей корня. Именно эндофитам отдается предпочтение при производстве биопрепаратов для сельского хозяйства. Однако в нашей работе было показано, что в большем количестве ПГБ накапливается штаммом *A. brasilense* Sp7, по сравнению с *A. brasilense* Sp245.

Таким образом, при использовании *A. brasilense* в качестве основы биопрепаратов для растениеводства необходимо учитывать не только их ростстимулирующую активность, но и способность выживать при внесении в ризосферу и при хранении биопрепаратов.



1. Методом ИК-фурье-спектроскопии проведен мониторинг накопления ПГБ бактериями *A. brasilense* Sp7 в сравнении с *A. brasilense* Sp245 при культивировании на средах с  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (лимитирующего фактора) в диапазоне концентраций 0,05-0,21 г/л в течение 6 сут.

2. Показано, что при равных условиях *A. brasilense* Sp7 синтезирует ПГБ ~ в 2,5 раза больше, по сравнению с *A. brasilense* Sp245. Максимум накопления ПГБ для обоих штаммов приходится на 3 сут при выращивании с 0,1 г/л  $\text{NH}_4\text{Cl}$ .

3. Клетки *A. brasilense* Sp7, выращенные в течение 3 сут с 0,05 г/л  $\text{NH}_4\text{Cl}$  накапливают 37% ПГБ от сухой биомассы.

#### Список использованных источников

1. Naumann, D. Infrared Spectroscopy in Microbiology / D. Naumann // Encyclopedia of Analytical Chemistry. Meyers R. A. (Ed.). Chichester: Wiley, 2000. P. 102-131.
2. Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy for monitoring and determining the degree of crystallisation of polyhydroxyalkanoates (PHAs) / M. Kansiz [et al.] // Anal. Bioanal. Chem. 2007. V. 388, N 5–6. P. 1207–1213.
3. Responses of *Azospirillum brasilense* to nitrogen deficiency and to wheat lectin: a diffuse reflectance infrared Fourier transform (DRIFT) spectroscopic study / A. A. Kamnev [et al.] // Microb. Ecol. 2008. V. 56, N 4. P. 615-624.
4. Fibach-Paldi, S. Key physiological properties contributing to rhizosphere adaptation and plant growth promotion abilities of *Azospirillum brasilense* / S. Fibach-Paldi, S. Burdman, Y. Okon // FEMS Microbiol. Lett. 2011. V. 326, N 2. P. 99-108.
5. Cassán F. *Azospirillum* sp. in current agriculture: From the laboratory to the field / F. Cassán, M. Diaz-Zorita // Soil Biol. Biochem. 2016. V. 103. P. 117–130.
6. Bashan, Y. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances / Y. Bashan, G. Holguin, L. E. de-Bashan // Can. J. Microbiol. 2004. V. 50. P. 521–577.