



УДК 579.222.4

## ИК-ФУРЬЕ-СПЕКТРОСКОПИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ НАКОПЛЕНИЯ ПОЛИ-3-ГИДРОКСИБУТИРАТА КЛЕТКАМИ *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* ПРИ РАЗЛИЧНОЙ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ И КОНЦЕНТРАЦИИ АММОНИЯ В ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЕ



В. В. Паршина, Ю. А. Дятлова, А. В. Тугарова

Паршина Виктория Валерьевна, студент кафедры биохимии и биофизики, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, parshina-v-v@yandex.ru

Дятлова Юлия Анатольевна, аспирант лаборатории биохимии, Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, jdyatlova2013@yandex.ru

Тугарова Анна Владимировна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биохимии, Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, tugarova\_anna@mail.ru

Многие бактерии синтезируют в ответ на неблагоприятные условия окружающей среды сложные полиэфиры класса полигидроксиалканоатов (ПГА). Эти биополимеры, накапливаясь внутри бактериальных клеток в виде гранул, позволяют бактериям лучше противостоять негативным внешним условиям и служат резервными источниками углерода и энергии. Ризосферные бактерии вида *Azospirillum brasilense* синтезируют лишь один из ПГА – поли-3-гидроксибутират (ПГБ) – в качестве ответной реакции на стрессовые факторы. Знание принципов и условий синтеза ПГБ важно как для понимания существования азоспирилл в естественной среде обитания, так и при использовании их в качестве биоудобрений – для сохранения их жизнеспособности. В настоящей работе с помощью метода инфракрасной (ИК) фурье-спектроскопии исследовано накопление ПГБ клетками штаммов *A. brasilense* Sp7 и Sp245 при выращивании бактерий в течение 6 сут. на синтетической малатно-солевой питательной среде с добавлением различных концентраций хлорида аммония (0.05, 0.10 и 0.21 г/л). Сравнительный анализ ИК-фурье-спектров образцов полученных биомасс бактерий показал, что при субоптимальных исходных концентрациях связанного азота в среде накопление ПГБ штаммом *A. brasilense* Sp7 в течение 1–6 сут. культивирования происходит более интенсивно, чем штаммом Sp245. При этом наибольшее относительное количество ПГБ в биомассе накапливалось штаммом *A. brasilense* Sp7 при исходной концентрации  $\text{NH}_4\text{Cl}$  в среде 0.10 г/л после 3 сут. культивирования.

**Ключевые слова:** *Azospirillum*, поли-3-гидроксибутират, ИК-фурье-спектроскопия.

DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-3-331-335

### Введение

Многие микроорганизмы способны к синтезу сложных полиэфиров класса полигидроксиалканоатов (ПГА). Данные биополимеры синтезируются бактериями в ответ на неблагоприятные условия окружающей среды, такие как дефицит

питательных веществ, присутствие соединений тяжелых металлов и др. Как известно, ПГА накапливаются внутри бактериальных клеток в виде гранул и позволяют бактериям лучше противостоять негативным внешним условиям, а также являются резервными источниками углерода и энергии [1]. С другой стороны, биополимеры класса ПГА являются экологически безопасной альтернативой традиционным пластикам: они быстро разрушаются в окружающей среде и по своим физическим свойствам сходны с синтетическими пластиками. Одним из самых простых полиэфиров класса ПГА является поли-3-гидроксибутират (ПГБ), наиболее изученный биопластик из класса ПГА микробного происхождения, состоящий из мономеров  $\beta$ -оксимасляной кислоты.

Бактерии *Azospirillum brasilense*, обитающие в ризосфере растений и способные образовывать ассоциации с корнями многих растений [2], синтезируют ПГБ в качестве ответной реакции на стрессовые факторы [3–6]. Эти ризобактерии также используются в составе биоудобрений для улучшения роста и урожайности растений [7, 8].

Знание принципов и условий синтеза ПГБ важно как для понимания существования азоспирилл в естественной среде обитания, так и при использовании их в качестве биоудобрений – для сохранения их жизнеспособности.

Целью данной работы был подбор условий культивирования для бактерий *A. brasilense* для получения максимального количества ПГБ при минимальном времени роста культуры. Для работы были выбраны одни из наиболее изученных штаммов *A. brasilense*: Sp7 и Sp245, отличающиеся занимаемыми ими экологическими нишами в ризосфере и поведением в сходных условиях [3, 4, 6]. Штамм *A. brasilense* Sp245 является эндофитом, способным к внутриклеточной/внутрикорневой колонизации, в то время как Sp7 может колонизировать корни растений только поверхностно.

В качестве аналитического метода использована инфракрасная (ИК) фурье-спектроскопия, позволяющая получить ценную структурную информацию и одновременно проводить монито-



ринг относительного содержания отдельных макрокомпонентов сложных биологических систем, включая бактериальную биомассу [3–6, 9–13].

### Материалы и методы

В работе были использованы штаммы *A. brasilense* Sp7 (ATCC 29145) [14] и Sp245 [15], полученные из Коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН (WDCM 1021). Бактерии выращивали на синтетической малатной среде (СМС, pH 6.8), предложенной Дей и Доберейнер [16]. Железо в среду вносили в хелатной форме ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 2.0 г/л; нитрилотриуксусная кислота – 5.6 г/л) из расчета 10 мл раствора на литр среды перед автоклавированием. Соли  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  и  $\text{CaCl}_2$  были приготовлены в виде стоковых 100-кратных стерильных растворов, которые добавляли в среду культивирования после автоклавирования последней. Среду стерилизовали в течение 30 мин при 121°C.

Посевной материал выращивали при 28–31°C аэробно в колбах Эрленмейера объемом 250 мл, содержащих по 100 мл СМС, в течение 18–22 ч до оптической плотности 0.9–1.1. Инокулят вносили из расчета 1 мл на 100 мл среды. Контроль чистоты культуры осуществлялся методом «раздавленной капли» на микроскопе «Olympus» (модель C011, Япония) при увеличении в 400 раз. Плотность культуры определяли с помощью спектрофотометра (Specol 221;  $\lambda = 600$  нм).

Для мониторинга синтеза ПГБ бактерии штаммов *A. brasilense* Sp245 и Sp7 выращивали на среде СМС с добавлением 0.05, 0.10 и 0.21 г/л  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Культуры растили в аэробных условиях при температуре 31°C в течение 6 сут. Мониторинг синтеза ПГБ осуществлялся методом ИК-фурье-спектроскопии *in situ* (без выделения ПГБ из биомассы). После 1, 2, 3 и 6 сут. в стерильных условиях отбиралось по 10 мл культуры. Отобранные образцы центрифугировали (10000g, 7 мин), трижды отмывали физиологическим раствором (8.5 г NaCl на 1 л дистиллированной воды), осадок клеток высушивали в сушильном шкафу при 40–50°C, тщательно растирали в агатовой ступке и ресуспендировали в 150–200 мкл воды (MilliQ). Полученную суспензию наносили на подложку из специального стекла (ZnSe, прозрачного в ИК-области) и высушивали при 45°C. ИК-спектры образцов культур измеряли на ИК-фурье-спектрометре Nicolet 6700 (Thermo Electron Corporation, США) в режиме пропускания (transmission) в диапазоне 4000–400  $\text{cm}^{-1}$  с накоплением 64 разверток спектров (разрешение 4  $\text{cm}^{-1}$ ) при температуре  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ . Обработку спектров проводи-

ли с помощью стандартной программы OMNIC, поставляемой вместе со спектрометром.

Расчет относительного количества синтезированного ПГБ ( $\alpha$ ) проводили, используя формулу [9]

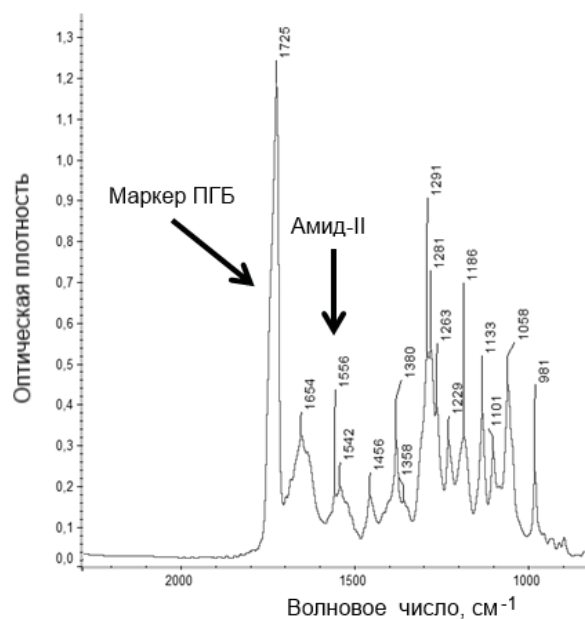
$$\alpha = I_{\nu(\text{C}=\text{O})} / I_{\text{амид-II}}, \quad (1)$$

где  $I_{\nu(\text{C}=\text{O})}$  – интенсивность полосы валентных колебаний карбонильной группы (C=O) в ПГБ (~1730)  $\text{cm}^{-1}$  как маркера содержания ПГБ;  $I_{\text{амид-II}}$  – интенсивность полосы амид-II (соответствующей клеточным белкам; ~1550  $\text{cm}^{-1}$ ).

### Результаты и их обсуждение

В работе для оценки относительного содержания ПГБ в бактериальной биомассе был использован метод ИК-фурье-спектроскопии. В отличие от других методов, применяемых для определения ПГБ (например, ВЭЖХ), он требует минимальных затрат (без сложных процедур пробоподготовки) и минимальных количеств образца. В основе метода ИК-фурье-спектроскопии лежит регистрация колебательных переходов функциональных групп (групп атомов в молекулах, связанных химическими связями) под действием ИК-излучения, вызывающих изменение дипольного момента функциональных групп в молекулах вещества. ИК-спектры микробных клеток являются специфичными и отражают наличие всех типов биологических молекул в образце.

На рисунке представлен спектр бактериальной культуры *A. brasilense* Sp7, выращенной в течение 3 сут. в присутствии 0.10 г/л  $\text{NH}_4\text{Cl}$ .



ИК-фурье-спектр высушенной биомассы штамма *A. brasilense* Sp7, выращенного в течение 3 сут. в присутствии 0.10 г/л  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . ПГБ – поли-3-гидроксибутират



Накопление ПГА в биомассе определяют по характерным для этих полиэфиров полосам, в первую очередь по наиболее интенсивной полосе валентных колебаний карбонильной группы сложноэфирного фрагмента (в области 1720–1750  $\text{см}^{-1}$ ). Данная полоса использовалась нами в работе как маркер ПГБ. Известно, что в бактериальной клетке содержание белка составляет порядка 40–60% и для определенных бактерий в сходных условиях изменяется несущественно

[17], что в ИК-спектроскопии позволяет использовать интенсивности характеристических полос клеточных белков амид-I (в области 1620–1680  $\text{см}^{-1}$ ) или амид-II (около 1550  $\text{см}^{-1}$ ) как внутренний стандарт [9, 17]. На основании анализа спектров рассчитывалось отношение интенсивности полосы – маркера ПГБ к интенсивности полосы амид-II по описанной выше методике [9]. В таблице представлены рассчитанные соотношения ( $\alpha$ ) для измеренных спектров исследуемых образцов.

**Соотношение интенсивностей ( $\alpha$ ; см. формулу (1) полос ПГБ (около 1730  $\text{см}^{-1}$ ) и амид-II (около 1550  $\text{см}^{-1}$ ) в ИК-фурье-спектрах биомассы бактерий при накоплении поли-3-гидроксибутирата (ПГБ) штаммами *A. brasilense* Sp7 и Sp245**

Время, сут.	Концентрация $\text{NH}_4\text{Cl}$ 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	8.46	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  $\text{NH}_4\text{Cl}$  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  $\text{см}^{-1}$  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 [18]. 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.

Таким образом, на основании проведенных экспериментальных исследований и расчетов показано, что при субоптимальных исходных концентрациях связанного азота в среде (0.05–0.21 г/л  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) 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.

#### Благодарности

Авторы выражают благодарность профессору, доктору химических наук А. А. Камневу, ведущему научному сотруднику лаборатории биохимии ИБФРМ РАН (Саратов), за помощь в интерпретации и описании полученных результатов. Представленные ИК-фурье-спектроскопические исследования проводили в Центре коллективного пользования научным оборудованием в области физико-химической биологии и нанобиотехнологии «Симбиоз» ИБФРМ РАН. Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ (проект № 17-08-01696-а).

#### Список литературы

1. Kadouri D., Jurkevitch E., Okon Y., Castro-Sowinski S. Ecological and agricultural significance of



- bacterial polyhydroxyalkanoates // Crit. Rev. Microbiol. 2005. Vol. 31. P. 55–67.
2. *Bashan Y., de-Bashan L. E.* How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth – a critical assessment // Adv. Agron. 2010. Vol. 108. P. 77–136.
  3. *Kamnev A. A., Tugarova A. V., Antonyuk L. P., Tarantilis P. A., Kulikov L. A., Perfliev Yu. D., Polissiou M. G., Gardiner P. H. E.* Instrumental analysis of bacterial cells using vibrational and emission Mössbauer spectroscopic techniques // Anal. Chim. Acta. 2006. Vol. 573–574. P. 445–452.
  4. *Kamnev A. A.* FTIR spectroscopic studies of bacterial cellular responses to environmental factors, plant-bacterial interactions and signalling // Spectrosc. Intern. J. 2008. Vol. 22, № 2–3. P. 83–95.
  5. *Kamnev A. A., Sadovnikova J. N., Tarantilis P. A., Polissiou M. G., Antonyuk L. P.* Responses of *Azospirillum brasilense* to nitrogen deficiency and to wheat lectin : a diffuse reflectance infrared Fourier transform (DRIFT) spectroscopic study // Microb. Ecol. 2008. Vol. 56, № 4. P. 615–624.
  6. *Kamnev A. A., Tugarova A. V., Tarantilis P. A., Gardiner P. H. E., Polissiou M. G.* Comparing poly-3-hydroxybutyrate accumulation in *Azospirillum brasilense* strains Sp7 and Sp245 : the effects of copper(II) // Appl. Soil Ecol. 2012. Vol. 61. P. 213–216.
  7. *Fibach-Paldi S., Burdman S., Okon Y.* Key physiological properties contributing to rhizosphere adaptation and plant growth promotion abilities of *Azospirillum brasilense* // FEMS Microbiol. Lett. 2011. Vol. 326, № 2. P. 99–108.
  8. *Cassán F., Diaz-Zorita M.* *Azospirillum* sp. in current agriculture : From the laboratory to the field // Soil Biol. Biochem. 2016. Vol. 103. P. 117–130.
  9. *Naumann D.* Infrared Spectroscopy in Microbiology // Encyclopedia of Analytical Chemistry / ed. R. A. Meyers. Chichester : Wiley, 2000. P. 102–131.
  10. *Kamnev A. A., Mamchenkova P. V., Dyatlova Yu. A., Tugarova A. V.* FTIR spectroscopic studies of selenite reduction by cells of the rhizobacterium *Azospirillum brasilense* Sp7 and the formation of selenium nanoparticles // J. Mol. Struct. 2017. Vol. 1140. P. 106–112.
  11. *Tugarova A. V., Shelud'ko A. V., Dyatlova Yu. A., Filip'echeva Yu. A., Kamnev A. A.* FTIR spectroscopic study of biofilms formed by the rhizobacterium *Azospirillum brasilense* Sp245 and its mutant *Azospirillum brasilense* Sp245.1610 // J. Mol. Struct. 2017. Vol. 1140. P. 142–147.
  12. *Tugarova A. V., Mamchenkova P. V., Dyatlova Yu. A., Kamnev A. A.* FTIR and Raman spectroscopic studies of selenium nanoparticles synthesised by the bacterium *Azospirillum thophilum* // Spectrochim. Acta Part A : Mol. Biomol. Spectrosc. 2018. Vol. 192. P. 458–463.
  13. *Kamnev A. A., Tugarova A. V., Dyatlova Yu. A., Tarantilis P. A., Grigoryeva O. P., Fainleib A. M., De Luca S.* Methodological effects in Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy : Implications for structural analyses of biomacromolecular samples // Spectrochim. Acta Part A : Mol. Biomol. Spectrosc. 2018. Vol. 193. P. 558–564.
  14. *Tarrand J. J., Krieg N. R., Döbereiner J.* A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov // Can. J. Microbiol. 1978. Vol. 24, № 8. P. 967–980.
  15. *Baldani V. L. D., Baldani J. I., Döbereiner J.* Effects of *Azospirillum* inoculation on root infection and nitrogen incorporation in wheat // Can. J. Microbiol. 1983. Vol. 29, № 8. P. 924–929.
  16. *Day J. M., Döbereiner J.* Physiological aspects of N<sub>2</sub>-fixation by a *Spirillum* from *Digitaria* roots // Soil Biol. Biochem. 1976. Vol. 8, № 1. P. 45–50.
  17. *Kansiz M., Billman-Jacobe H., McNaughton D.* Quantitative determination of the biodegradable polymer poly(β-hydroxybutyrate) in a recombinant *Escherichia coli* strain by use of mid-infrared spectroscopy and multivariate statistics // Appl. Environ. Microbiol. 2000. Vol. 66, № 8. P. 3415–3420.
  18. *Kansiz M., Dominguez-Vidal A., McNaughton D., Lendl B.* Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy for monitoring and determining the degree of crystallisation of polyhydroxyalkanoates (PHAs) // Anal. Bioanal. Chem. 2007. Vol. 388, № 5–6. P. 1207–1213.
- Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Poly-3-Hydroxybutyrate Accumulation by *Azospirillum brasilense* Cells at Various Cultivation Periods and Ammonium Concentrations in the Culture Medium**
- V. V. Parshina, Yu. A. Dyatlova, A. V. Tugarova**
- Victoria V. Parshina, ORCID 0000-0003-1885-9422, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, parshina-v-v@yandex.ru
- Yulia A. Dyatlova, ORCID 0000-0002-8451-7271, Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, 13, Entuziastov Ave., Saratov, 410049, Russia, jdyatlova2013@yandex.ru
- Anna V. Tugarova, ORCID 0000-0001-6017-4289, Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, 13, Entuziastov Ave., Saratov, 410049, Russia, tugarova\_anna@mail.ru
- Many bacteria, in response to unfavourable environmental conditions, can synthesise polyesters of the polyhydroxyalkanoate (PHA) class. These biopolymers, accumulating intracellularly in the form of granules, help the bacteria to cope with negative environments and are utilised as reserve sources of carbon and energy. Rhizobacteria of the species *Azospirillum brasilense* synthesise a single type of PHA, poly-3-hydroxybutyrate (PHB), in response to stress factors. Knowledge of the principles and conditions of PHB synthesis is of importance both for understanding the subsistence of azospirilla in their natural habitats and for their use



as biofertilisers, to preserve their viability. In this work, Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy was used to study PHB accumulation by cells of *Azospirillum brasilense* strains Sp7 и Sp245 during growth of the bacteria for 6 days in standard malate salt medium containing various concentrations of ammonium chloride (0.05, 0.10 and 0.21 g/l). Comparative analysis of FTIR spectra of the bacterial biomass samples showed that, at suboptimal initial concentrations of bound nitrogen in the medium, PHB accumulation after 1 to 6 days of cultivation was more intensive in *A. brasilense* strain Sp7 than in strain Sp245. Maximum relative amounts of PHB were accumulated by biomass of *A. brasilense* Sp7 grown for 3 days at the initial  $\text{NH}_4\text{Cl}$  concentration in the culture medium 0.10 g/l.

**Key words:** *Azospirillum*, poly-3-hydroxybutyrate, Fourier transform infrared spectroscopy.

**Acknowledgments:** *The authors are grateful to Professor A. A. Kamnev, D.Sc., Leading Researcher at the Laboratory of Biochemistry, Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences (IBPPM RAS, Saratov, Russia), for his help in interpreting the experimental spectroscopic data. The experiments using Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy were performed on the equipment of the "Simbioz" Centre for the Collective Use of Research Equipment in the field of physical-chemical biology and nanobiotechnology at IBPPM RAS, Saratov, Russia (FTIR spectrometer Nicolet 6700). This work was supported in part by the Russian Foundation for Basic Research (project no. 17-08-01696-a).*

**Образец для цитирования:**

Паршина В. В., Дятлова Ю. А., Тугарова А. В. ИК-Фурье-спектроскопический анализ накопления поли-3-гидроксибутирата клетками *Azospirillum brasilense* при различной продолжительности культивирования и концентрации аммония в питательной среде // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2018. Т. 18, вып. 3. С. 331–335. DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-3-331-335

**Cite this article as:**

Parshina V. V., Dyatlova Yu. A., Tugarova A. V. Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Poly-3-Hydroxybutyrate Accumulation by *Azospirillum brasilense* Cells at Various Cultivation Periods and Ammonium Concentrations in the Culture Medium. *Izv. Saratov Univ. (N. S.), Ser. Chemistry. Biology. Ecology*, 2018, vol. 18, iss. 3, pp. 331–335 (in Russian). DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-3-331-335