

ОБРАЗОВАНИЕ ЦИСТОПОДОБНЫХ ПОКОЯЩИХСЯ ФОРМ
SINORHIZOBIUMMELILOTI P221 ПОД ВЛИЯНИЕМ
АЛКИЛОКСИБЕНЗОЛА

А.Ю. ПОГОРЕЛОВА, Н.Г. ЛОЙКО*, А.А. ВАНЬКОВА

(Кафедра микробиологии)

Установлено, что внесение химического аналога микробных аутоиндукторов анабиоза — алкилоксибензола C_{12} -АОБ — в концентрациях 5×10^{-4} – 5×10^{-5} М в клеточные суспензии неспорообразующих симбиотрофных бактерий *Sinorhizobium meliloti* на предстационарной фазе роста вызывает образование цистоподобных покоящихся клеток (ЦПК), предназначенных для выживания в неблагоприятных и стрессовых условиях. ЦПК характеризовались длительным сохранением жизнеспособности, снижением метаболической активности, устойчивостью к повреждающим воздействиям (терморезистентность), особенностями ультраструктурной организации. Длительно хранившиеся ЦПК при прорастании сохраняли подвижность в полужидкой среде. Внесение C_{12} -АОБ в концентрации 10^{13} М индуцировало образование мумифицированных клеток, теряющих жизнеспособность при сохранении интактности. Показано, что АОБ играют значительную роль в адаптации микроорганизмов к неблагоприятным условиям окружающей среды.

Ключевые слова: *Sinorhizobium meliloti*, цистоподобные покоящиеся клетки, алкилоксибензолы, аутоиндукторы анабиоза, рефрактерность, подвижность.

Важным адаптационным свойством почвенных микроорганизмов, в т.ч. неспорообразующих, является формирование покоящихся клеток, предназначенных для переживания неблагоприятных для роста или стрессовых условий. У ризобиальных бактерий эти процессы усложнены тем, что кроме стадии свободноживущих гетеротрофных клеток в их жизненном цикле присутствует стадия симбиотического взаимодействия с бобовыми растениями. Благодаря интенсивным исследованиям последних лет начинает накапливаться информация о том, какие факторы обеспечивают выживание ризобий в почве и их конкуренцию за об-

разование клубеньков [10]. Результаты таких исследований имеют важное значение для создания высокоэффективных бактериальных препаратов, позволяющих снижать потребность в азотных удобрениях и улучшать качество почв. Эффект от применения симбиотрофных азотфиксаторов, заменяющих внесение минерального азота (по подсчетам экономистов США) составляет 45-210 долл. на 1 га (в зависимости от вида растения) [9]. Поэтому первоочередной задачей становится создание бактериальных препаратов, содержащих клетки ризобиальных бактерий, выживающих в стрессовых условиях и способных к эффек-

* Институт микробиологии имени С.Н. Виноградского РАН, г. Москва.
Работа выполнена при поддержке РФФИ, грант № 07-04-01011.

тивным симбиотрофным взаимоотношениям с растениями. Такими клетками могут быть покоящиеся формы, высокоустойчивые к повреждающим воздействиям и сохраняющие способность к возобновлению роста.

В ранее проведенных исследованиях было обнаружено, что микроорганизмы различных таксономических групп (*Saccharomyces cerevisiae*, *Micrococcus luteus*, *Thioalkalivibrio versutus*) при действии внеклеточных аутоиндукторов анабиоза формируют цистоподобные покоящиеся клетки (ЦПК), обладающие всеми характеристиками покоящихся форм [3, 4]. Механизм действия аутоиндукторов анабиоза, по своей химической природе относящихся к алкилоксибензолам (АОБ), основан на их способности к комплексообразованию с мембранными липидами и клеточными биополимерами за счет слабых физико-химических взаимодействий [1]. При повышении концентрации АОБ в клетках изменяется структурное состояние и функциональная активность мембран, наблюдаются дегидратация клеточного протопласта, изменение каталитической активности ферментных белков на фоне повышения их функциональной стабильности, изменяется топология ДНК [1, 2, 8]. В результате клетка приобретает состояние покоя, сопряженное с повышенной устойчивостью к повреждающим факторам внешней среды, не теряя при этом способности к возобновлению метаболической активности. Целью данной работы было изучение образования покоящихся клеток симбиотрофной бактерии *Sinorhizobium meliloti* Dangeard при действии повышающихся концентраций химического аналога микробных аутоиндукторов анабиоза.

Материалы и методы

Почвенные симбиотрофные бактерии *Sinorhizobium meliloti* P221 (получены из коллекции ИБФРМ РАН, Саратов; выделены из корневой зоны тростника южного) выращивали на маннитной пи-

тательной среде следующего состава (г/л): дрожжевой экстракт — 1,0; маннит — 2,0; K_2HPO_4 — 0,2; KH_2PO_4 — 0,2; $MgSO_4$ — 0,2; $CaCl_2$ — 0,02. Инокулят — культуру стационарной фазы роста — вносили в количестве, дающем начальную оптическую плотность (ОП) клеточной суспензии 0,1 ($X = 650$ нм, $l = 10$ мм, «Specord», Германия). Культивирование проводили в колбах на 250 мл (50 мл среды) на качалке (140-160 об/мин) при 28°C.

Покоящиеся формы бактерий получали при внесении в культуры фазы замедленного роста химического аналога аутоиндукторов анабиоза микроорганизмов C_{12} -АОБ в виде этанольных растворов до конечных концентраций 5×10^{-5} - 10^{-3} М при содержании этанола не более 5%. В контрольных вариантах в культуры бактерий вносили эквивалентное количество этанола. Жизнеспособность клеток *S. meliloti* определяли по числу колониеобразующих единиц (КОЕ) при высеве соответствующих разведений на агаризованные среды (концентрация агара 2%). Термоустойчивость бактерий определяли по числу КОЕ после прогревания клеточных суспензий в ультратермостате U-10 при температуре 50 и 60°C в течение 10 мин. Эндогенное дыхание клеток определяли по методу Шольца — Островского на полярографе LP7E в кислородной ячейке объемом 1 мл [7]. Микроскопические наблюдения производили при помощи микроскопа «Amplival» (ГДР) с фазово-контрастным устройством. Коллективную подвижность ризобий оценивали по образованию колоний через 5 сут после посева клеток уколом бактериальной петлей в полужидкую агаризованную среду (концентрация агара 0,4%).

Эксперименты проводили в 2-4 сериях с 5-кратной повторностью измерений в каждой. Статистическую обработку данных вели с расчетом среднеквадратичных отклонений при использовании t-критерия Стьюдента для уровня достоверности $P > 0,95$.

Результаты и их обсуждение

Как было отмечено ранее, повышение в среде роста бактерий уровня аутоиндукторов анабиоза приводит к образованию цистоподобных покоящихся форм, обладающих рядом характеристик: длительным сохранением жизнеспособности; изменениями в морфологии и ультраструктурной организации клеток развитием рефрактерности; отсутствием экспериментально определяемого уровня эндогенного дыхания; повышенной устойчивостью к повреждающим воздействиям.

В наших экспериментах образование покоящихся форм *S. meliloti* индуцировали внесением химического аналога факторов анабиоза C₁₂-АОБ в предстационарную культуру бактерий (40 ч) до конечных концентраций 10⁻³, 5x10⁻⁴, 10⁻⁴, 5x10⁻⁵М. Воздействие ауторегулятора оказалось дозозависимым, а также развивалось во времени (табл. 1). Так, через 30 мин экспозиции бактерии, подвергнутые воздействию самой высокой из исследуемых концентраций C₁₂-АОБ (10⁻³ М), теряли способность к колониеобразованию (КОЕ). При фазово-контрастном микроскопировании наблюдали уменьшение клеток в размерах и приобретение ими рефрактерности. В суспензиях клеток с C₁₂-АОБ

в концентрации 5x10⁻⁴М через 30 мин и 5 сут инкубации жизнеспособность бактерий снижалась на 3,5 порядка, а через месяц не выявлялась совсем, при этом 90% бактерий приобретали рефрактерность (рис. 1). Внесение в бактериальную суспензию *S. meliloti* C₁₂-АОБ в наименьшей концентрации — 5x10⁻⁵ М вначале (30 мин) не сказывалось на численности КОЕ. Однако при длительной инкубации (5 сут — 1 мес) число клеток, способных образовывать колонии на агаризованной среде было на 39 и 83% соответственно выше, чем в контроле. Микроскопические наблюдения показали, что клетки становились более мелкими, рефрактерность развивалась у ~6-7% бактерий (в контрольных суспензиях — У 1-3%).

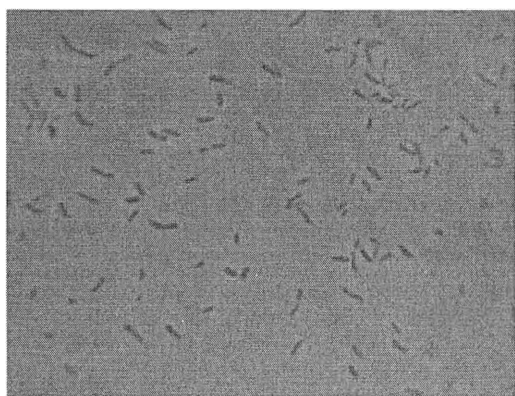
В дальнейших экспериментах было установлено, что клетки в длительно хранящихся опытных образцах не обладали экспериментально выявляемым уровнем эндогенного дыхания, что свидетельствовало об ингибировании их метаболической активности.

Полученные переживающие клетки опытных вариантов 5x10⁻⁴ М — 5x10⁻⁵ М обладали терморезистентностью. После обработки бактериальных суспензий при 50°С в течение 10 мин число жизнеспособных (КОЕ) клеток

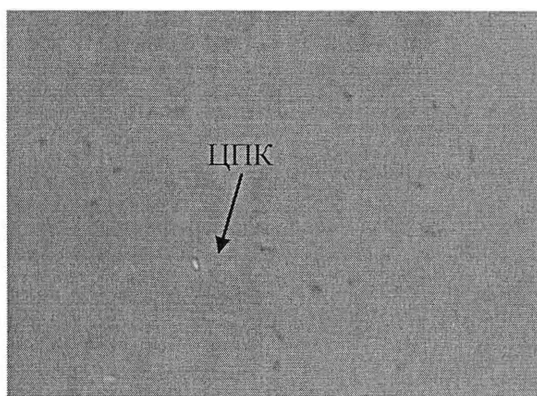
Т а б л и ц а 1

Число колониеобразующих клеток в клеточных суспензиях *S. meliloti* после внесения C₁₂-АОБ

Концентрация C ₁₂ -АОБ, М	Время хранения		
	численность, КОЕ/мл (% от контроля)		
	30 мин	5 сут	1 мес
Контроль	(6,9±0,2) × 10 ⁹ (100)	(2,3±0,1) × 10 ⁹ (100)	(4,2±0,2) × 10 ⁸ (100)
10 ⁻³	0 (0)	0 (0)	0 (0)
5 × 10 ⁻⁴	(1,0±0,1) × 10 ⁶ (0.02)	(6±0,4) × 10 ⁵ (0.03)	0 (0)
10 ⁻⁴	(5,9±0,2) × 10 ⁹ (85,5)	(2,1±0,1) × 10 ⁸ (9,1)	(5.1±0,3) × 10 ⁷ (11,9)
5 × 10 ⁻⁵	(6,7±0,3) × 10 ⁹ (97,1)	(3,2±0,2) × 10 ⁹ (139,1)	(7,7±0,5) × 10 ⁸ (183,3)



а)

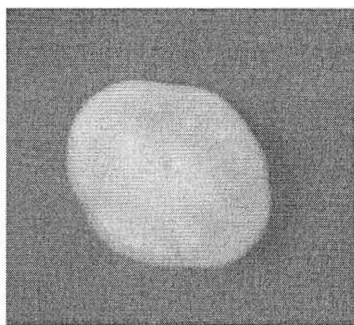


б)

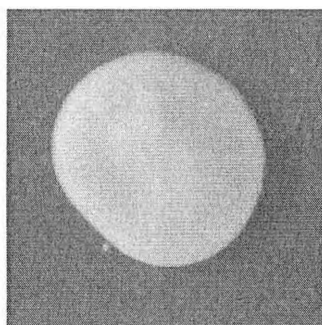
Рис. 1. Клетки *S. meliloti*. Микроскопирование в фазовом контрасте: а — клетки стационарной фазы роста (48 ч); б — клетки при воздействии C_{12} -АОБ в концентрации 5×10^{-4} М (1 мес)

в опытных образцах было в 4~5 раз больше, чем в контрольных. Воздействие температуры 60°C в течение 5 мин оказалось губительным как для контрольной, так и для опытных клеточных суспензий. Однако оно способствовало реактивации покоящихся некультивируемых клеток, полученных в экспериментах с экзогенным внесением C_{12} -АОБ в концентрации 5×10^{-4} М, жизнеспособность которых не выявлялась в стандартных условиях после посева на агаризованную среду.

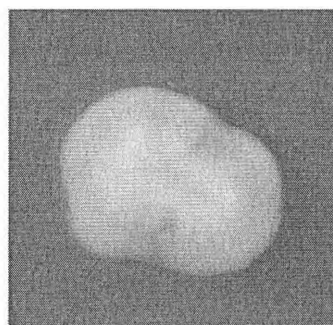
Так как бактерии *S. meliloti* являются представителями симбиотрофных микроорганизмов, то необходимой частью исследования было изучение коллективной подвижности клеток (оценивают визуально) в популяциях, вырастающих при рассеве покоящихся форм в полужидкий агар (рис. 2). Вегетативные клетки *S. meliloti* скоординированно распространялись из точки инокуляции с образованием регулярных кольцевых структур — роились (Swa^+ фенотип, от англ. swarming —



а)



б)



в)

Рис. 2. Коллективная подвижность в полужидкой агаризованной среде (0,4%) клеток *S. meliloti*, выросших из покоящихся форм, полученных при действии C_{12} -АОБ (5 сут): а — контроль; б — концентрация 10^{-4} М; в — концентрация 5×10^{-5} М

роение). На фоне роения наблюдалось распространение клеток с образованием микроколоний (Gri+ фенотип, от англ. granular inclusions) [6]. При расщепе покоящихся форм в полужидкий

агар тип их подвижности сохранялся (смешанный Swa+Gri+), а скорость движения была на уровне контроля (варианты $5 \times 10^{-5} \text{M}$, $5 \times 10^{-4} \text{M}$) или выше (вариант 10^{-4}M) (табл. 3).

Таблица 2

Термостабильность клеток *S. meliloti*, подвергнутых воздействию C_{12} -АОБ (хранившихся в течение месяца)

Вариант	Число жизнеспособных клеток, КОЕ/мл (% от КОЕ до термообработки)		
	до термообработки	55°C, 10 мин	60°C, 5 мин
Контроль	$(4,2 \pm 0,24) \times 10^8$ (100)	$(4,5 \pm 0,48) \times 10^4$ (0,01)	0
10^{-3}	0	0	0
5×10^{-4}	0	0	$(6,7 \pm 0,53) \times 10^3$
10^{-4}	$(5,1 \pm 0,34) \times 10^7$ (100)	$(2,2 \pm 0,1) \times 10^4$ (0,04)	0
5×10^{-5}	$(7,7 \pm 0,5) \times 10^8$ (100)	$(4,0 \pm 0,32) \times 10^5$ (0,05)	0

Таблица 3

Социальная подвижность клеток *S. meliloti*, подвергнутых воздействию C_{12} -АОБ

Время инкубации	Концентрация C_{12} -АОБ, М				
	диаметр зон распространения, мм				
	контроль	10^{-3}	5×10^{-4}	10^{-4}	5×10^{-5}
30 мин	19,75	0	15	25	15
5 сут	15	0	15	19,5	14
1 мес	11	0	0	15	11

Таким образом, впервые для симбиотрофных ризобий *S. meliloti* было показано, что они, как и другие неспорообразующие бактерии, способны в условиях повышения уровня аутоиндукторов анабиоза формировать цистоподобные покоящиеся клетки, обладающие всеми необходимыми характеристиками покоящихся форм бактерий (микроорганизмов). Численность и свойства образующихся покоящихся клеток зависели от концентрации ауто-

регулятора и времени хранения покоящихся клеток. Действие высоких концентраций C_{12} -АОБ (выше $5 \times 10^{-4} \text{M}$) приводит к необратимым последствиям, вызывая полную потерю клетками колониеобразующей способности (при сохранении интактности). Такие клетки можно отнести к описанным ранее мумифицированным формам [5]. Умеренные дозы ауторегулятора, напротив, способствуют поддержанию численности жизнеспособных клеток на более высоком по сравнению с контрольным уровне, а образующиеся переживающие формы обладают повышенной терморезистентностью и сохраняют способность к колониеобразованию и свойство подвижности. Полученные результаты могут быть использованы при создании бактериальных препаратов нового поколения, основой которых станут цистоподобные покоящиеся клетки бактерий, длительно сохраняющие жизнеспособность и устойчивость к повреждающим воздействиям.

Библиографический список

Бухарин О.В., Гинцбург А.Л., Романова Ю.М., Эль-Регистан Г.И. Механизмы выживания бактерий. М.: Медицина, 2005.

Давыдова О.К., Дерябин Д.Г., Эль-Регистан Г.И. Влияние химических аналогов микробных ауторегуляторов на чувствительность ДНК к УФ-облучению // Микробиология, 2006. Т. 75. № 5. С. 654—661.

Лойко Н.Г., Соина В.С., Сорокин Д.Ю., Митюшина Л.Л., Эль-Регистан Г.И. Образование покоящихся форм у грамтрицательных хемолитоавтотрофных бактерий *Thioalkalivibrio versutus* и *Thioalkalimicrobium aerophilum* // Микробиология, 2003. Т. 72, №3. С. 328-337.

Мулюкин А.Л., Луста К.А., Грязнова М.Н., Козлова А. Н., Дужа М.В., Дуда В.И., Эль-Регистан Г.И. Образование покоящихся форм *Vacillus cereus* и *Micrococcus luteus* // Микробиология, 1996. Т. 65. № 6. С. 782-789.

Сузина Н.Е., Мулюкин А.Л., Лойко Н.Г., Козлова А. Н., Дмитриев В.В., Шорохова А.П., Горленко В.М., Дуда В.И., Эль-Регистан Г.И. Тонкая структура мумифицированных клеток микроорганизмов, образующихся под влиянием химического аналога аутоиндуктора анабиоза // Микробиология, 2001. Т. 70. № 5. С. 1-11.

Шелудько А. В., Кацы Е. И. Образование на клетке *Azospirillum brasilense* полярного пучка пилей и поведение бактерий в полужидком агаре // Микробиология, 2001. Т. 70. № 5. С. 1-6.

Шольц К. Ф., Островский Д. Н. Ячейка для амперометрического определения кислорода // Методы современной биохимии. М.: Наука, 1975. С. 52-58.

Эль-Регистан Г.И., Мулюкин А.Л., Николаев Ю.А., Сузина Н.Е., Гальченко В.Ф., Дуда В.И. Адаптогенные функции внеклеточных ауторегуляторов микроорганизмов // Микробиология, 2006. Т. 75. № 4. С. 446-456.

Peterson T.L., Russel M.P. // J. Soil Water Conserv, 1991. V. 46. P. 229-233.

Spaink. H.P., Kondorosi. A., Hooykaas. P.J.J. // The Rhizobiaceae. Molecular Biology of Model plant-Associated Bacteria. Dordrecht. Boston. London. Kluwer Academic Publishers, 1998.

Рецензент — к. б. н. А.Н. Смирнов

SUMMARY

It was revealed that the addition of chemical analogue of microbial anabiosis — inducing factors — alkylhydroxybenzene C₁₂-AHB — to suspensions of non-spore-forming nitrogen-fixing bacteria *Sinorhizobium meliloti* in concentrations 5x10⁻⁴ — 5x10⁻⁵ M led to formation of dormant cyst-like cells intended for survival under adverse and stressful conditions. These dormant cells possessed the long-term maintenance of viability, the reduced or undetectable metabolic activity, the stability to damaging factors (heat-resistance), specific ultrastructure. After prolonged incubation, dormant cyst-like cells preserved the mobility in the semiliquid medium after germination and entering new development cycle. The addition of C₁₂-AHB at the high concentration 10⁻³M resulted in the formation of mummified forms that lost viability, being morphologically intact, the obtained data show a significant role of AHB in the adaptation of microorganisms to adverse environmental conditions.