

Министерство образования и науки Российской Федерации  
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ТОМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ (НИ ТГУ)  
Институт биологии, экологии, почвоведения, сельского и лесного хозяйства

Кафедра физиологии растений и биотехнологии

ДОПУСТИТЬ К ЗАЩИТЕ В ГЭК

Руководитель ООП

Д.б.н.

 Д.С. Воробьев

«15» июня 2020 г.

## ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

### НОВЫЕ ПРОКАРИОТЫ ИЗ ПОДЗЕМНОЙ БИОСФЕРЫ

по основной образовательной программе подготовки бакалавров  
направление подготовки 06.03.01 - Биология

Сагандыкова Малика Аскаровна

Руководитель ВКР

д-р. биол. наук, профессор



О.В.Карначук

подпись

«15» июня 2020 г.

Автор работы

студент группы № 01602



М. А. Сагандыкова

подпись

## СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	3
1 Спорообразующие сульфатредуцирующие прокариоты в подземной биосфере .....	5
1.1 Экологическое значение сульфатредукторов .....	5
1.2 Сульфатредуцирующие микроорганизмы глубинной биосферы .....	7
2 Спорообразование и образование газовых вакуолей у бактерий .....	8
2.1 Изучение спорообразования бактерий .....	8
2.2 Подходы к получению спор у <i>Bacillus subtilis</i> .....	8
2.3 Газовые вакуоли .....	9
3 Материалы и методы .....	12
3.1 Объект исследования .....	12
3.2 Используемые методы .....	14
3.2.1 Культивирование <i>Ca. Desulforudis audaxviator</i> .....	14
3.2.2 Получение спор <i>Ca. Desulforudis audaxviator</i> .....	15
3.2.3 Детекция образования спор у <i>Ca. Desulforudis audaxviator</i> .....	17
4 Результаты и обсуждение .....	20
Получение спор у бактерии <i>Desulforudis audaxviator</i> .....	20
ВЫВОДЫ .....	23
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	24
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ И ИСТОЧНИКОВ .....	25

## ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на многочисленные исследования, в настоящее время до сих пор существует глубокий интерес к исследованию микроорганизмов глубинной биосферы. Сульфатредуцирующие бактерии являются важной составляющей микробных сообществ глубинных экосистем суши.

Сульфатредукция микроорганизмами - это процесс огромного воздействия на окружающую среду, оно включает биогеохимическое воздействие, которое связано с глобальным биогеохимическим круговоротом серы, а большинство исследований связано с морскими средами из-за высокого содержания сульфатов. Сульфаты присутствуют практически во всех поверхностных водах и являются одними из важнейших анионов. Сульфатредуцирующие бактерии (СРБ) – анаэробные организмы, использующие сульфаты как конечные акцепторы электронов. СРБ распространены в бескислородных средах, где они играют важную роль в круговоротах серы и углерода. Эти бактерии могут являться большой проблемой для промышленности, например, при добыче нефти со дна моря, из-за образования высокоактивных сульфидов, токсичных и вызывающих коррозию. Тем не менее, эти организмы могут быть полезны, удаляя сульфаты и тяжелые металлы из потоков отходов (Muyzer, 2008). Было установлено, что сульфатредукция может составлять более 50% органической минерализации углерода в осадочных отложениях, что показывает важность сульфатредукторов в циклах и углерода, и серы и, следовательно, почему СРБ изучаются особенно углубленно.

Особый интерес представляет бактерия *Candidatus Desulforudis audaxviator* (Ca. *Desulforudis audaxviator*). Она обитает исключительно в подземных экосистемах и только недавно была получена в культуре (Karnachuk et al., 2019). Чтобы получить действительно чистую культуру, нужно соблюсти множество условий, в которых происходит ее выращивание, в том числе,

стерильность, подбор оптимальных условий для развития колонии (температура, pH, наличие или отсутствие воздуха, специальная питательная среда). Выделение штамма ВУФ в чистую культуру заняло больше двух лет из-за его медленного роста. До сих пор актуальным остается вопрос, связанный с распространением этой бактерии, ведь подземные водоемы, в которых были найдены ДНК микроорганизма, геологически никогда не соприкасались: пробы были отобраны в Южной Африке и в Томской области в России. Существует гипотеза, что в глобальном распространении *Candidatus Desulforudis audaxviator* участвуют споры с газовыми пузырьками (вакуолями).

**Целью** данного исследования является получение спор бактерии *Desulforudis audaxviator* для обнаружения газовых вакуолей и исследования роли спор при распространении данного микроорганизма.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Получить достаточную биомассу чистой культуры *Candidatus Desulforudis audaxviator*.
2. Рассмотреть различные методы получения спор у *Candidatus Desulforudis audaxviator* и применить некоторые из них.
3. Определить наиболее действенный метод получения спор у *Candidatus Desulforudis audaxviator*.
4. Сравнить влияние спермидина и введение/добавление стресс-фактора на процессы роста и спорообразования культуры *Candidatus Desulforudis audaxviator*.

# 1 Спорообразующие сульфатредуцирующие прокариоты в подземной биосфере

## 1.1 Экологическое значение сульфатредукторов

Сульфатредуцирующие микроорганизмы играют важную роль в преобразовании серы, особенно в анаэробных средах. Сульфат используется как питательное вещество и преобразуется до сульфида, который после этого может окисляться в кислородных условиях хемолитотрофными или в бескислородных условиях фототрофными серными бактериями. СРБ вносят свой вклад в цикл серы и углерода.

Из-за высоких концентраций сульфата в морской воде (28 мМ), бескислородные зоны морских систем являются преобладающими местообитаниями сульфатредукторов (Rabus, 2015).

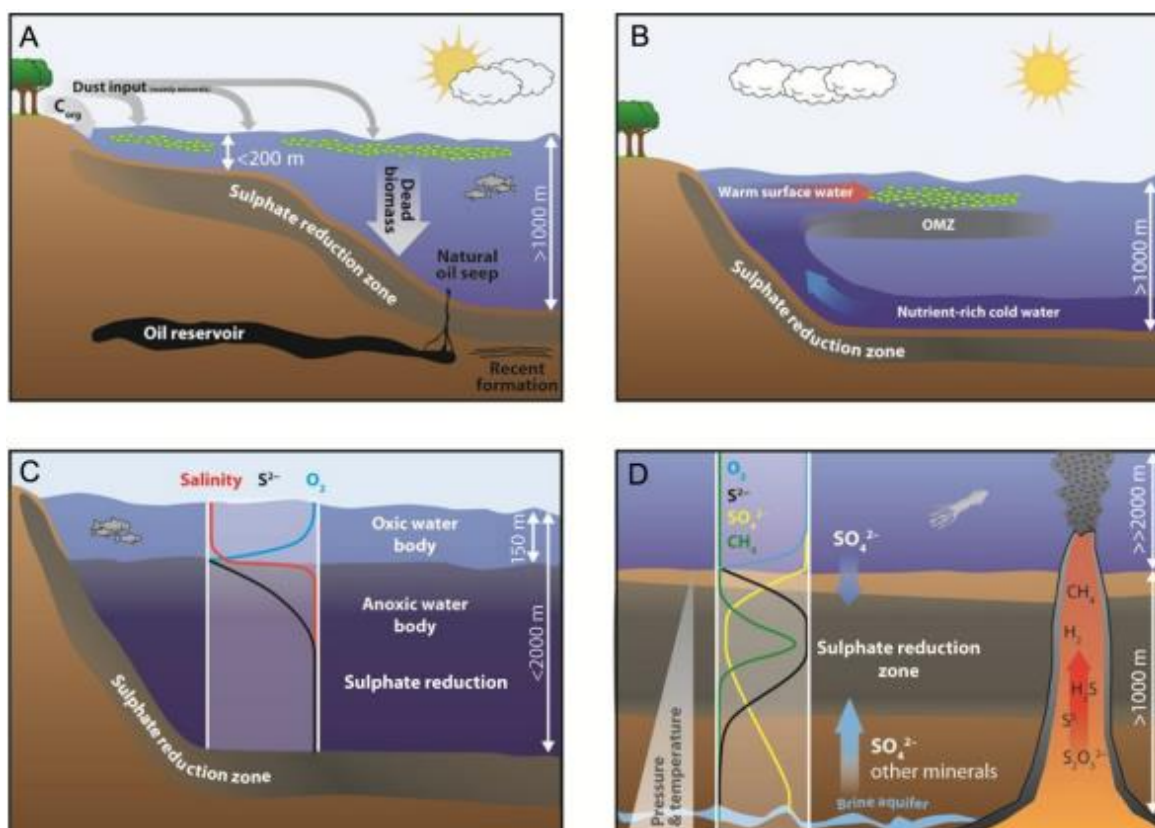


Рисунок 1 - Места обитания СРБ в морской среде и глубинной биосфере

А- Донные отложения шельфа и океана получают органический углерод из наземных источников (например, устьев рек), а также от мертвой биомассы первичных продуцентов

(фитопланктон); В - районы апвеллинга (например, у восточных побережий Северной и Южной Америки) характеризуются высоким импортом питательных веществ из глубоких холодных океанских вод. СРБ могут вносить свой вклад в минерализацию органического углерода, а также в цикл серы; С - в многослойных морских бассейнах (например, в Черном море) значительная часть водной толщи постоянно аноксична, и поэтому является довольно стабильной средой обитания для СРБ; D -подповерхностные отложения в глубоководных районах моря могут поступать из земной коры, создавая зону глубокого сульфатного восстановления (Rabus, 2015)

Сульфатредукторы распространены повсеместно и могут быть найдены во многих естественных и искусственных средах, где присутствует сульфат. СРБ были обнаружены и выделены из морских отложений гидротермальных источников, углеводородных флюидов и грязевых вулканов, они в большом количестве присутствуют в гиперсоленых микробных матах и выживают даже при больших концентрациях кислорода. СРБ были обнаружены в местообитаниях с экстремальными значениями рН, таких как кислые шахтные дренажные участки, где рН может достигать до 2, и в содовых озерах, где рН может достигать 10 (Muyzer, 2008). СРБ были выделены из нефтяных месторождений и из глубинных слоев биосферы. Они также присутствуют в пресноводных отложениях, ризосфере растений, водоносных горизонтах и в искусственных системах, таких, как анаэробные водоочистные сооружения. Большинство СРБ являются свободноживущими, но некоторые из них присутствуют в сообществах с другими микроорганизмами, такими как метанотрофные археи, или даже в более близких отношениях, например, вместе с сероокисляющими гаммапротеобактериями в качестве эндосимбионтов в морском черве *Olavius algarvensis*, тем самым обеспечивая хозяина питательными веществами. (Muyzer, 2008).

Следует отметить, что самые последние филогенетические анализы, основанные на последовательностях *dsrAB* (кодирующих диссимиляторную сульфитредуктазу), указывают на более чем 13 семейных линий СРБ без культивируемых представителей (Muller et al., 2015), что предполагает,

возможно, более широкое природное разнообразие сульфатредукторов, чем известно в настоящее время. (Rabus, 2015).

## 1.2 Сульфатредуцирующие микроорганизмы глубинной биосферы

Морские донные отложения характеризуются перепадами уровней питательных веществ и обилием микроорганизмов (Kallmeyer et al., 2012). Доступность сульфата и легко используемых органических субстратов обычно уменьшается с глубиной, за исключением глубоких слоев, куда сульфат поступает из нижележащих слоев морской воды, метана или нефти, просачивающихся из подземных источников (Cowen et al., 2003).

Ранее количество СРБ осадочных отложений глубинной биосферы не было хорошо изучено (Fry et al., 2008), но недавно проведенный скрининг функциональных генных маркеров (*argA*) показал значительное обилие сульфатредукторов в донных отложениях (Blazejak, 2011; Breuker et al., 2013). Недавно было обнаружено, что эндоспоры микроорганизмов столь же многочисленны, как и вегетативные клетки в глубоких донных отложениях (Lomstein et al., 2012). Споры СРБ могут относиться к роду *Desulfotomaculum* (de Rezende et al., 2012). Большое разнообразие сульфатредуцирующих бактерий, включая представителей *Desulfobulbaceae*, *Desulfobacteraceae* и других до сих пор неизвестных групп, также наблюдалось в морских глубоководных отложениях, характеризующихся высоким содержанием CO<sub>2</sub> и низким уровнем pH (Yanagawa et al., 2013).

Помимо морских глубинных недр, наземные системы также содержат сульфатредукторов, например, глубокие подземные песчаники (Sass, 2004), сверхглубокие шахты, базальтовые водоносные горизонты (Baker et al., 2003; Lin et al., 2006), а также гранитные водоносные горизонты (Suzuki et al., 2014).

## **2 Спорообразование и образование газовых вакуолей у бактерий**

### **2.1 Изучение спорообразования бактерий**

Некоторые бактерии способны образовывать эндоспоры при определенных условиях. Эндоспоры - это спящие формы; они обладают структурными и биохимическими характеристиками, которые четко отличают их от соответствующих растущих организмов. Спорообразование рассматривается как примитивная форма клеточной дифференцировки, поскольку оно имеет ряд общих черт с клеточным развитием высших организмов. До 90% популяции клеток может быть индуцировано к образованию спор за относительно короткое время в определенной среде. Популяцию можно заставить спорулировать довольно синхронно, хотя каждая клетка в популяции, по-видимому, не нуждается во взаимодействии со своими соседями - нет никакого межклеточного взаимодействия, чтобы сформировать сложную многоклеточную структуру. В настоящее время существует много работ, посвященных исследованию спорообразования бактерий. Большая часть работы была проделана с представителями родов *Bacillus* и *Clostridium* (Piggot, 1976).

### **2.2 Подходы к получению спор у *Bacillus subtilis***

При хорошем запасе источников углерода и азота наблюдается рост бактерий, а спорообразование подавляется, дефицит любого из них может привести к образованию спор.

Шефер и его коллеги выдвинули рабочую гипотезу о том, что спорообразование подавляется азотсодержащим метаболитом, внутриклеточная концентрация которого зависит от скорости метаболизма доступных источников углерода и азота. Споруляция также может быть инициирована фосфатным голоданием, при этом подавляющие метаболиты могут быть



фосфорилированы. В богатых средах низкая вероятность того, что клетка будет спорулировать, но она возрастает в более бедных средах. Исследования спорообразования в культурах в хемостате показали, что частота спорообразования в конкретной среде является функцией скорости роста. Полученные результаты подтвердили, что споруляция может происходить с высокой частотой при ограничении источника углерода или азота, но не при ограничении жизненно необходимых ионов или веществ, которые клетка не может синтезировать сама.

Предполагалось, что подавление спорообразования во многом сходно с катаболическим подавлением индуцибельных ферментов, которое также вызывается присутствием источников углерода или азота. Сейчас известно, что для преодоления этих двух типов подавления действуют различные механизмы. Тем не менее, в ряде случаев было показано, что в этих двух явлениях участвуют аналогичные соединения.

### **2.3 Газовые вакуоли**

Ряд бактерий и архей производят внутриклеточные наполненные газом белковые структуры – газовые пузырьки, которые функционируют как аппарат для регуляции глубины в водной среде. Стенка этих газовых пузырьков проницаема для молекул газа и состоит из небольшого гидрофобного белка GvpA, который образует однослойную стенку. Кроме того, для образования газовых пузырьков требуется несколько второстепенных структурных, вспомогательных или регуляторных белков. В различных организмах было идентифицировано 8-14 генов, кодирующих белки газовых пузырьков. Было показано, что их экспрессия регулируется факторами окружающей среды.

Светопреломляющие внутриклеточные тела, содержащие газ и обеспечивающие клеткам плавучесть, были первоначально обнаружены у цианобактерий (Klebahn et al., 1895). Впоследствии было обнаружено, что эти

газовые вакуоли содержат скопления газовых пузырьков (Bowen et al., 1965), и аналогичные структуры были также найдены в архее *Halobacterium salinarum* (Petter, 1931; Houwink, 1956). Газовые пузырьки представляют собой веретенообразные или цилиндрические органеллы шириной 0,045-0,2 мкм и длиной 0,1-2 мкм (рис. 3 а, б). Во время образования газовых пузырьков появляются небольшие биконические структуры (биконы), которые вырастают и превращаются в веретенообразные или цилиндрические газовые пузырьки. Их газопроницаемая стенка состоит исключительно из белков; в ней нет ни липидов, ни углеводов. Стенка газового пузырька имеет толщину всего 2 нм и состоит из одного слоя белка GvpA, который образует "ребра", проходящие почти перпендикулярно длинной оси пузырька. Также в цианобактериях и галоархеях были найдены дополнительные белки Gvp, необходимые для образования газовых пузырьков, их гораздо меньше, чем GvpA. Образование газовых пузырьков включает в себя в общей сложности 8-14 различных белков Gvp, которые кодируются в кластерах генов *gvp* (Pfeifer, 2012). Такие кластеры генов *gvp* встречаются у различных бактерий и архей, что позволяет предположить раннюю эволюцию этой органеллы и / или горизонтальный перенос генов. Когда их образуются достаточное количество, газовые пузырьки обеспечивают плавучесть клеткам и позволяют вертикальное перемещение в водной толще.

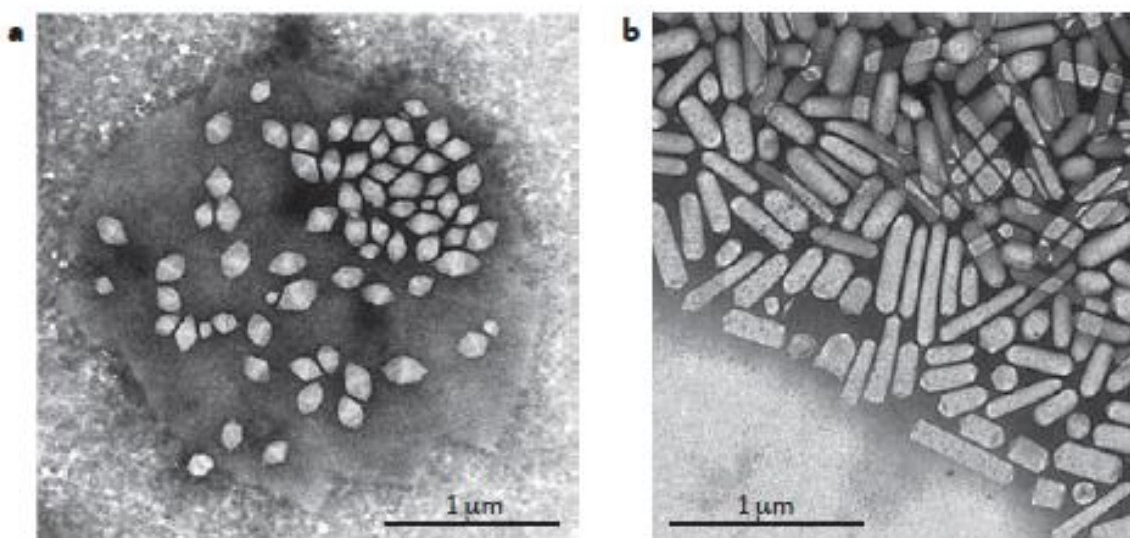


Рисунок 2 - Газовые пузырьки: а - электронная микрофотография лизированной *Halobacterium salinarum*, содержащая веретенообразные газовые пузырьки; б - газовые пузырьки цилиндрической формы, выделенные из *Hbt. Salinarum* (Pfeifer, 2012)

Помимо обеспечения плавучести, наличие большого количества газовых везикул также может уменьшить объем цитоплазмы и тем самым увеличить отношение поверхности клетки к объему, что может помочь клеткам выжить в стрессовых условиях.

Наиболее часто газовые везикулы встречаются в цианобактериях, анаэробных фотосинтетических бактериях, холодолюбивых гетеротрофных бактериях, мезофильных галоархеях.

Стенка газового пузырька свободно проницаема для газов, и поэтому газ внутри пузырька находится в равновесии с газом, растворенным в цитоплазме или среде; при этом хранения газа не происходит (Walsby, 1994). Газовые пузырьки стабильны по своей структуре и сохраняют свою морфологию даже в вакууме. Однако они необратимо разрушаются при воздействии давления. Критическое давление колеблется от 0,09 МПа до более 1 МПа.

Многие гетеротрофные бактерии производят увеличенное количество газовых пузырьков при низкой температуре, во время пищевого голодания и во

время осмотического стресса, что указывает на то, что газовые вакуоли могут играть существенную роль в стрессовых условиях. Регулирующие системы, задействованные в этих случаях, еще не изучены.

Газовые пузырьки нашли практическое применение в области биотехнологии. Рекомбинантные газовые везикулы галоархей были использованы в изучении антигенов при иммунизации мышей. Газовые пузырьки содержали различные пептиды вируса иммунодефицита обезьян (Sremac et al., 2010). Такие рекомбинантные газовые везикулы могут служить экономически выгодным методом скрининга патогенных пептидов и их антигенного потенциала. Кроме того, газовые пузырьки, заполненные кислородом и обработанные глутаральдегидом, были использованы для лучшего снабжения кислородом клеток млекопитающих (Sundararajan et al., 2006).

### **3 Материалы и методы**

#### **3.1 Объект исследования**

*Ca. Desulforudis audaxviator* (CDA) – сульфатредуцирующая бактерия, обнаруженная впервые в 2002 году в пробах воды в золотодобывающей шахте Мпоненг (Mponeng) в Южной Африке недалеко от Йоханнесбурга на глубине 2,8 км (Lin et al., 2006). Это был единственный микроорганизм, представляющий самодостаточную экосистему, способную самовоспроизводиться без всякого контакта с остальной земной биосферой. Бактерия была изолирована от поверхности Земли в течение нескольких миллионов лет, приспособившись к выживанию в экстремальных условиях — при температурах более 60 °C и pH 9.3.

Микробиологам Томского государственного университета удалось выделить бактерию *Ca. Desulforudis audaxviator*, штамм BYF, из подземных вод термального источника, расположенного в Белом Яре в Верхнекетском районе

Томской области. ДНК бактерии, найденной в Сибири, практически идентична ДНК «смелого путешественника» из Южной Африки (Karnachuk et al., 2019).

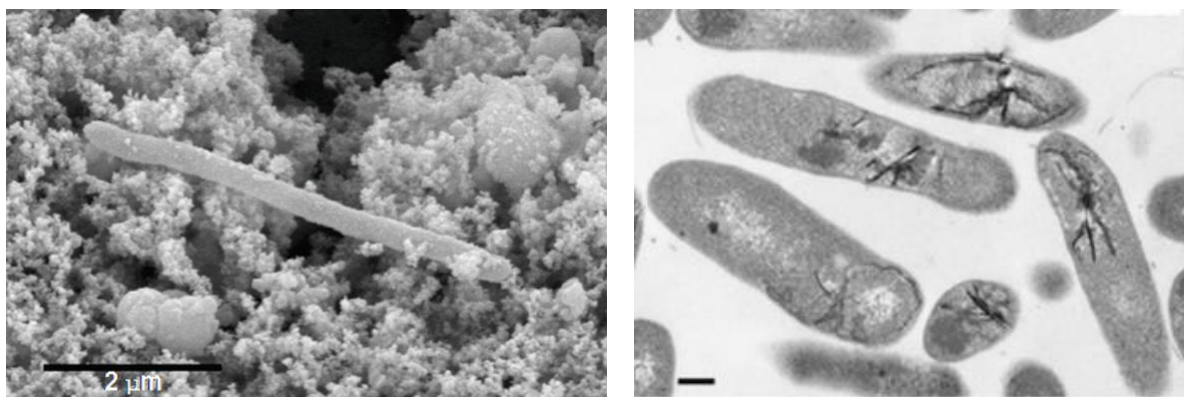


Рисунок 3 - Клетки *Ca. Desulforudis audaxviator*, электронная микроскопия: а – сканирующая электронная микроскопия (Chivian et al., 2008), видна одна длинная палочковидная бактерия на фоне мелких минеральных частиц; б – трансмиссионная электронная микроскопия (Karnachuk et al., 2019)

Поразительной морфологической особенностью штамма BYF являются газовые пузырьки, которые встречались только в спорообразующих клетках. Известно, что наполненные газом белковые газовые пузырьки обеспечивают клеткам плавучесть (Pfeifer F, 2012). Таким образом, споры CDA, связанные с газовыми пузырьками, могут представлять собой механизм, позволяющий штамму распространяться на большие расстояния, что делает его “смелым путешественником”, в английском переводе с латинского “audax-viator”. CDA может происходить из глубоких подземных недр и оказываться на поверхности с выбросом грунтовых вод в поверхностные среды. На поверхности микроорганизмы могут распространяться на большие расстояния, например, с помощью воздуха. Колонизация новых наземных подповерхностных сред CDA может произойти через выброс метеоритной воды в более глубокие горизонты.

Одно из ранних исследований *Desulfotomaculum*, ближайшего родственника *Desulforudis*, сообщило о спорах, связанных с газовыми пузырьками (Widdel et al., 1981). Последующие исследования показали, что споры *Desulfotomaculum* могут выживать в суровых температурных условиях.

## 3.2 Используемые методы

### 3.2.1 Культивирование *Ca. Desulforudis audaxviator*

Для применения различных методик с целью получения спор у бактерии *Ca. Desulforudis audaxviator*, прежде всего необходимо было получить хорошую биомассу.

Культивирование происходило в среде Видделя с использованием субстратов: ацетат, формиат с добавлением сульфида Na, витаминов и микроэлементов, селена и вольфрама в качестве кофакторов роста. pH среды составлял 8 – 8.2, температура 55 °C.

Добавление ацетата (2 mM) в формиатсодержащую среду способствует росту штамма и максимальному выходу ростовых реакций до  $2 \times 10^5$  клеток/мл. Использование среды формиат + ацетат дало достаточную плотность клеток для проведения измерений в жидкой культуре. Максимальная удельная скорость роста 0,027/ч при удвоении времени 25,8 ч наблюдалась при выращивании ВУФ в среде ацетата формиата при оптимальной температуре 55 °C.

Добавление в среду спермидина в концентрации 0,1 мл на 100 мл среды способствовало увеличению биомассы до 10 - 15 кл в поле.

Ранее сотрудниками и студентами Томского Государственного университета уже были предприняты попытки получения спор у CAD. Было опробовано следующее:

- Добавление 40 mM ацетата при посеве;
- Добавление NaCl в концентрации 65 г/500 мл после зарастания культуры;

- Изменение pH до 11 при добавлении 4М NaOH после застывания культуры;
- Изменение температуры хранения: после застывания культуры сутки она была при температуре 65°, а затем 2 часа при 4°;
- Понижение pH до 3 после застывания культуры;
- Продувание банки 100% O<sub>2</sub> после застывания культуры.

При этом спор получено не было.

### **3.2.2 Получение спор *Ca. Desulforudis audaxviator***

#### **Добавление концентрированного Na<sub>2</sub>S**

Ранее таким способом были получены споры у родственного CAD *Desulfosporosinus* при добавлении в среду с заросшей культурой Na<sub>2</sub>S, концентрация которого была увеличена в 100 раз. Поэтому было решено опробовать данную методику и на *Ca. Desulforudis audaxviator*.

При стандартном культивировании сульфатредуцирующих бактерий в питательную среду вносится Na<sub>2</sub>S в концентрации 240 мг/л.

Во флакон с заросшей культурой (100 мл) было добавлено 2 мл Na<sub>2</sub>S в концентрации 24000 мг/л. На следующие сутки было замечено уменьшение биомассы в 5 раз. После этого клетки осадили, так как возникло предположение, что в осадке могут быть споры.

Также был опробован метод добавления Na<sub>2</sub>S в концентрации 24000 мг/л в среду при новом посеве. При использовании данной методики результаты получены не были.

## **Прогревание (Пастеризация)**

Предварительно осажденные клетки из колбы объемом 120 мл прогревали при температуре 90° в течение 15 и 20 минут.

## **Воздействие тяжелых металлов на ВУГ**

При анализе устойчивости к различным ионам тяжелых металлов также наблюдались споры. При добавлении  $\text{Co}^{2+}$  в концентрации 25 мг/л и  $\text{Cd}^{2+}$  в концентрации 25 мг/л.

## **Воздействие спермидином**

В ходе исследования был проведен эксперимент: сравнить стимуляцию роста бактерий при спермидине и при действии стресс-фактора (высокая концентрация  $\text{Na}_2\text{S}$ ), а также при его отмене (Таблица 1). Эксперимент был проведен 3 раза.

В 4 флакона по 120 мл добавляли спермидин и  $\text{Na}_2\text{S}$  в концентрации в 100 раз больше обычной:

- 1) Из колбы с добавленным  $\text{Na}_2\text{S}$  пересеять в колбу со стандартной концентрацией  $\text{Na}_2\text{S}$  (А), а в другую колбу добавить  $\text{Na}_2\text{S} \times 100$ ;
- 2) Из колбы с добавленным спермидином осуществить такой же пересев со спермидином (С), а в другую добавить  $\text{Na}_2\text{S} \times 100$  и спермидин (D).



Таблица 1 – Стимуляция роста бактерий спермидином и Na<sub>2</sub>S (24000 мг/л)

№	Фактор	
	Na <sub>2</sub> S	Спермидин
A	Стандартная концентрация	-
B	x100	-
C	Стандартная концентрация	+
D	x100	+

### 3.2.3 Детекция образования спор у *Ca.Desulforudis audaxviator*

Для идентификации спор проводили микроскопический анализ предварительно сконцентрированной культуры клеток CDA.

#### Осаждение клеток BYF

- I.
  1. Разделить осадок и надосадочную жидкость, разлив содержимое флакона в 2 фалькона;
  2. Центрифугировать 2 мин. 1000-2000 оборотов;
  3. Надосадочную жидкость перелить в чистый фалькон;
  4. Центрифугировать надосадочной жидкости 10 мин. 11000 оборотов
  5. Слить надосадочную жидкость.
  
- II.
  1. Перелить содержимое фалькона с осадком в 2 эппендорфа

2. Центрифугировать 2 мин. 1000-2000 оборотов
3. Перенести содержимое пипеткой в чистый эппендорф
4. Центрифугировать 10 мин. 13,400 оборотов

### Микроскопический анализ

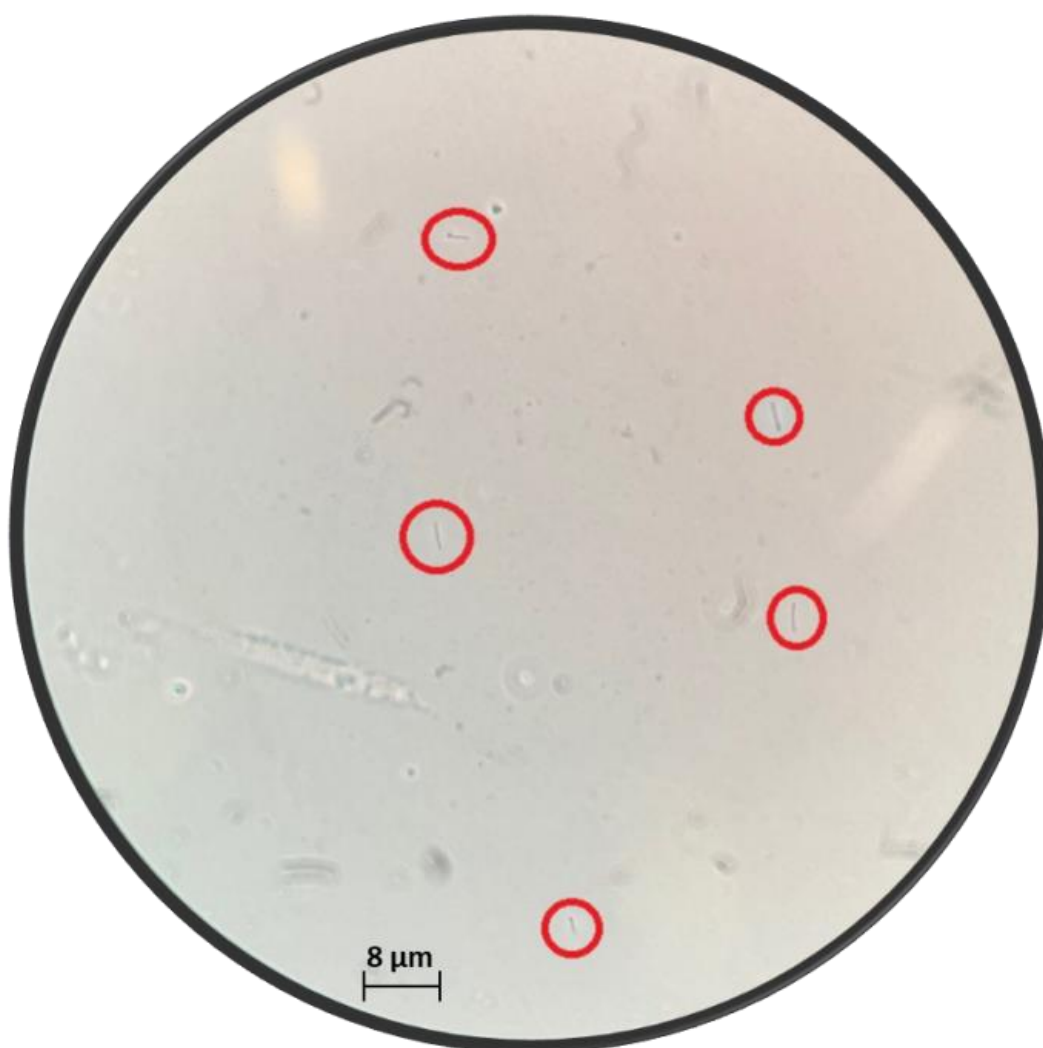


Рисунок 4 - Клетки *Ca. Desulforudis audaxviator*, полученная биомасса штамма BYF

После того, как осадок и надосадочная жидкость были разделены с помощью центрифугирования, их исследовали под микроскопом. Было

обнаружено большое количество мертвых клеток бактерий. Также присутствовали споры в небольшом количестве (до 3 штук в поле).

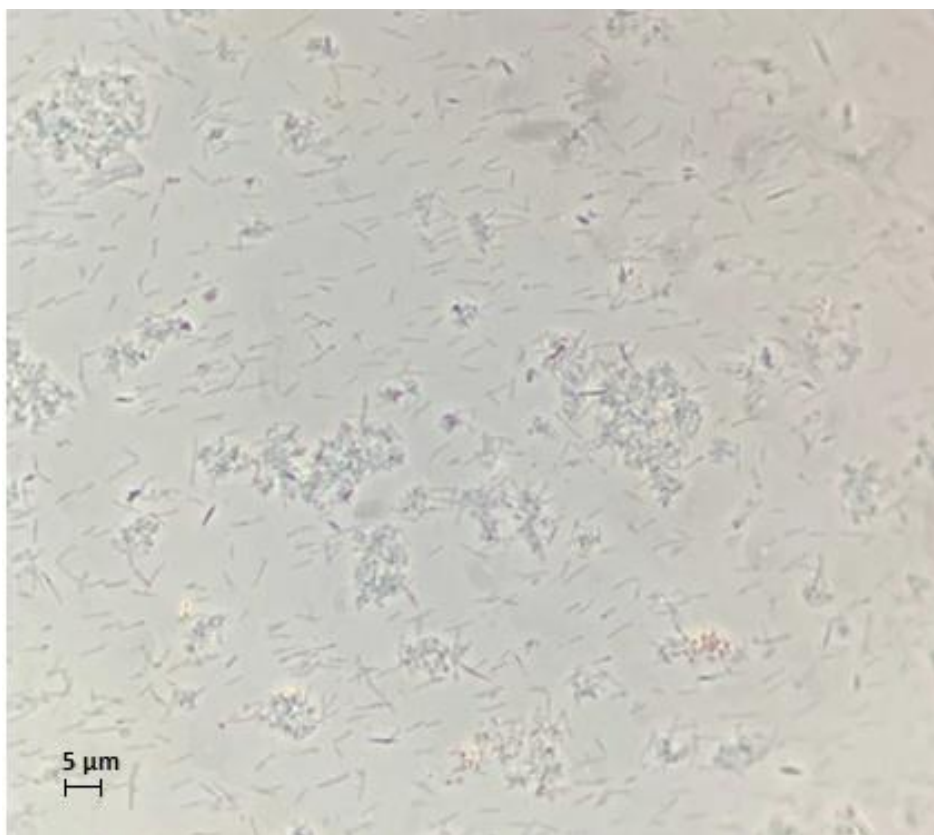


Рисунок 5 - Клетки BYF, убитые высокой концентрацией  $\text{Na}_2\text{S}$

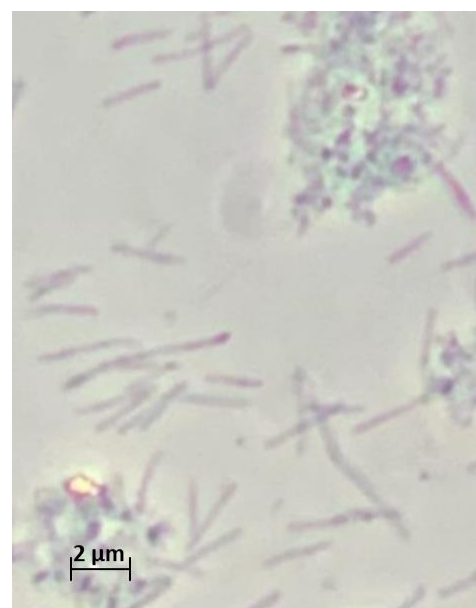
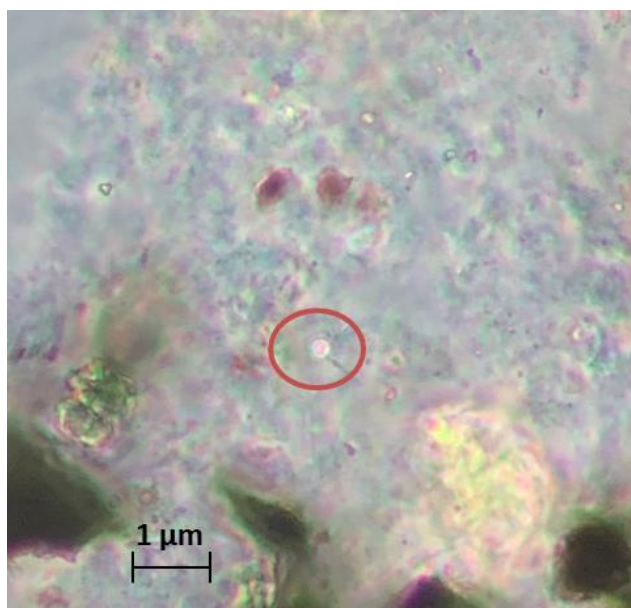


Рисунок 6 - Клетки BYF: а - в состоянии споры; б - в процессе споруляции

## **4 Результаты и обсуждение**

### **Получение спор у бактерии *Desulforudis audaxviator***

#### **Добавление концентрированного $\text{Na}_2\text{S}$**

Для инициации спорообразования в жидкую культуру при посеве добавляли концентрированный раствор  $\text{Na}_2\text{S}$  (24000 мг/л). При этом споры получены не были.

Добавление большего количества сульфида натрия к выросшей культуре клеток CDA инициировало спорообразование, однако, у лишь незначительного числа клеток. Были обнаружены споры в небольшом количестве (до 3 штук в поле) и мертвые клетки бактерий (Таблица 2).

#### **Воздействие спермидином**

При сравнении стимуляции роста бактерий с помощью спермидина и стресс-фактора (высокая концентрация  $\text{Na}_2\text{S}$ ), а также при его отмене, были получены следующие результаты:

Во флаконах А (стандарт), В ( $\text{Na}_2\text{S} \times 100$ ), D ( $\text{Na}_2\text{S} \times 100$  + спермидин) не было клеток. Во флаконе С (стандарт + спермидин) было 3 бактерии в поле. При отмене стресс-фактора не наблюдалось предполагаемое увеличение биомассы, равно как и при его воздействии. Увеличение биомассы дало добавление спермидина.

#### **Прогревание (Пастеризация)**

Предварительно осажденные клетки из колбы объемом 120 мл прогревали при температуре 90° в течение 15 и 20 минут.

Получили споры в количестве 3-4 споры в поле (Таблица 2).

Таблица 2 - Способы инициирования спорообразования BYF

№ п/п	Фактор	Время воздействия (мин.)	Спорооб- разование (+/-)	Примечание
1	Температура 90° С	15	+	4 споры в поле зрения микроскопа
		20	+	3 споры в поле зрения микроскопа
2	Na <sub>2</sub> S (24000 мг/л)	-	+	2 споры в поле зрения микроскопа
3	Добавление тяжелые металлов: Co <sup>2+</sup> (25 мг/л), Cd <sup>2+</sup> (25 мг/л)	-	+	1 спора в поле зрения микроскопа
4	Добавление 40 мМ ацетата	-	-	при посеве
5	Добавление NaCl в концентрации 65 г/500 мл	-	-	после застания культуры
6	Доведение pH до 11 при добавлении 4М NaOH	-	-	после застания культуры

7	Изменение температуры хранения:	после застания культуры сутки она была при температуре 65°, а затем 2 часа при 4°	-	-
8	Понижение pH до 3	-	-	после застания культуры
9	Продувание банки 100% O <sub>2</sub>	-	-	после застания культуры

## ВЫВОДЫ

1. При анализе нескольких методов получения спор у *Candidatus Desulforudis audaxviator* наиболее действенным оказался метод прогревания спор: максимальное количество спор в поле – 4.

2. При сравнении влияния спермидина и введения/добавления стресс-фактора на рост культуры, было выявлено, что спермидин стимулирует рост культуры сильнее, чем действие стресс-фактора.

3. Результаты тестирования методик получения спор были положительными для получения нескольких спор, однако для перехода всей культуры в споруляцию необходимо опробовать другие методы.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Было опробовано несколько методик получения спор у сульфатредуцирующей бактерии *Ca. Desulforudis audaxviator*.

Чтобы добиться перехода всей культуры в состояние споруляции, необходимо опробовать другие методики или оптимизировать параметры метода, который оказался самым успешным в данном исследовании.



## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ И ИСТОЧНИКОВ

1. Muyzer G. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria / G. Muyzer, A. J. M. Stams // Nat. Rev. Microbiol. — 2008. — № 6. — P. 441–454.
2. Karnachuk O. V. Domestication of previously uncultivated *Candidatus Desulforudis audaxviator* from a deep aquifer in Siberia sheds light on its physiology and evolution / Olga V. Karnachuk, Yulia A. Frank, Anastasia P. Lukina, Vitaly V. Kadnikov, Alexey V. Beletsky, Andrey V. Mardanov & Nikolai V. Ravin // The ISME Journal. — 2019. — P. 1-13.
3. Rabus R. A Post-genomic view of the ecophysiology, catabolism and biotechnological relevance of sulphate-reducing prokaryotes / R. Rabus, S. Venceslau, L. Wohlbrand, G. Voordouw, J. D. Wall, I. C. Pereira // Advances in Microbial Physiology. — 2015. — № 15. — P. 71.
4. Muller A. L. Phylogenetic and environmental diversity of DsrAB-type dissimilatory (bi)sulfite reductases / A. L. Muller, K. U. Kjeldsen, T. Rattei, M. Pester, A. Loy. // The ISME Journal. — 2015. — № 9(5). — P. 1152–1165.
5. Kallmeyer J. Global distribution of microbial abundance and biomass in subseafloor sediment / J. Kallmeyer, R. Pockalny, R. R. Adhikari, D. C. Smith, S. D'Hondt // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. — 2012. — № 109 (40). — P. 16213–16216.
6. Cowen J. P. Fluids from aging ocean crust that support microbial life / J. P. Cowen, S. J. Giovannoni, F. Kenig, H. P. Johnson, D. Butterfield, M. S. Rappe, M. Hutnak, P. Lam // Science. — 2003. — № 299 — P. 120–123.

7. Fry J. C. Prokaryotic biodiversity and activity in the deep subseafloor biosphere / J. C. Fry, R. J. Parkes, B. A. Cragg, A. J. Weightman, G. Webster // FEMS Microbiology Ecology. — 2008. — № 66 — P. 181–196.
8. Blazejak A. Real-time PCR quantification and diversity analysis of the functional genes *aprA* and *dsrA* of sulfate-reducing prokaryotes in marine sediments of the Peru continental margin and the Black Sea / A. Blazejak, A. Schippers // Frontiers in Microbiology. — 2011.— № 2 — P. 253.
9. Breuker A. Microbial community analysis of deeply buried marine sediments of the New Jersey shallow shelf (IODP Expedition 313) / A. Breuker, S. Stadler, A. Schippers // FEMS Microbiology Ecology. — 2013. — № 85 — P. 578–592.
10. Lomstein B. A. Endospore abundance, microbial growth and necromass turnover in deep sub-seafloor sediment / B. A. Lomstein, A. T. Langerhuus, S. D'Hondt, B. B. Jørgensen, A. J. Spivack // Nature. — 2012. — № 484 — P. 101–104.
11. de Rezende J. R. Dispersal of thermophilic *Desulfotomaculum* endospores into Baltic Sea sediments over thousands of years / J. R. de Rezende, K. U. Kjeldsen, C. R. Hubert, K. Finster, A. Loy, B. B. Jørgensen // ISME Journal. — 2012. — № 7 — P. 72–84.
12. Yanagawa K. Metabolically active microbial communities in marine sediment under high-CO<sub>2</sub> and low-pH extremes / K. Yanagawa, Y. Morono, D. de Beer, M. Haeckel, M. Sunamura, T. Futagami // ISME Journal. — 2013. — № 7 — P. 555–567.
13. Sass H. Isolation of sulfate-reducing bacteria from the terrestrial deep subsurface and description of *Desulfovibrio cavernae* sp. nov. / H. Sass,

H. Cypionka // Systematic and Applied Microbiology. — 2004. — № 27 — P. 541–548.

14. Baker B. J. Related assemblages of sulphate-reducing bacteria associated with ultradeep gold mines of South Africa and deep basalt aquifers of Washington State / B. J. Baker, D. P. Moser, B. J. MacGregor, S. Fishbain, M. Wagner, N. K. Fry // Environmental Microbiology. — 2003. — № 5 — P. 267–277.

15. Lin L. H. Long-term sustainability of a high-energy, low-diversity crustal biome / L. H. Lin, P. L. Wang, D. Rumble, J. Lippmann-Pipke, E. Boice, L. M. Pratt // Science. — 2006. — № 314 — P. 479–482.

16. Suzuki Y. Biogeochemical signals from deep microbial life in terrestrial crust / Y. Suzuki, U. Konno, A. Fukuda, D. D. Komatsu, A. Hirota, K. Watanabe // PLoS One. — 2014. — № 9 (12) — P. 83–113.

17. Piggot P. J. Genetic aspects of bacterial endospore formation / P. J. Piggot, J. G. Coote // Bacteriological reviews. — 1976. — № 40(4) — P. 908–962.

18. Lin Li-Hung. Long-Term Sustainability of a High-Energy, Low-Diversity Crustal Biome / Li-Hung Lin // Science. — 2006. — № 314 — P. 479–482.

19. Pfeifer F. Distribution, formation and regulation of gas vesicles / F. Pfeifer // Nature Reviews Microbiology. — 2012. — № 10 — P. 705–715.

20. Widdel F. Studies on dissimilatory sulfate-reducing bacteria that decompose fatty acids / F. Widdel, N. Pfennig // Archives of Microbiology. — 1981. — № 129 — P. 395–400.

21. Klebahn H. Gasvakuolen, ein Bestandteil der Zellen der wasserblütenbildenden Phycochromaceen / H. Klebahn // Flora (Jena). — 1895. — № 80 — P. 241–282.
22. Bowen C. C. Blue-green algae: fine structure of the gas vacuoles / C. C. Bowen, T. E. Jensen // Science. — 1965. — № 147 — P. 1460–1461.
23. Petter H. On bacteria of salted fish / H. Petter // Proceedings of the National Academy of Sciences. — 1931. — № 34 — P. 1417–1423.
24. Houwink A. L. Flagella, gas vacuoles and cell wall structure in *Halobacterium halobium*; an electron microscope study / A. L. Houwink // Journal of general microbiology. — 1956. — № 15 — P. 146–150.
25. Walsby A. E. Gas vesicles / A. Walsby // Microbiological Review. — 1994. — № 58 — P. 94–144.
26. Sremac M. SIVsm Tat, Rev, and Nef1: functional characteristics of r-GV internalization on isotypes, cytokines, and intracellular degradation / M. Sremac, E. S. Stuart // BMC Biotechnology. — 2010. — № 10 — P. 54.
27. Sundararajan A. Use of cyanobacterial gas vesicles as oxygen carriers in cell culture / A. Sundararajan, L. K. Ju // Cytotechnology. — 2006. — № 52 — P. 139–149.

# Отчет о проверке на заимствования №1



Автор: [sagandykova.malika@gmail.com](mailto:sagandykova.malika@gmail.com) / ID: 6612611

Проверяющий: [sagandykova.malika@gmail.com](mailto:sagandykova.malika@gmail.com) / ID: 6612611)

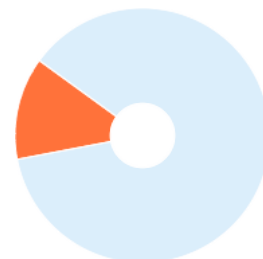
Отчет предоставлен сервисом «Антиплагиат»- <http://users.antiplagiat.ru>

## ИНФОРМАЦИЯ О ДОКУМЕНТЕ

№ документа: 7  
Начало загрузки: 20.06.2020 07:22:29  
Длительность загрузки: 00:00:01  
Имя исходного файла: ВКР Сагандыкова1.pdf  
Название документа: ВКР Сагандыкова1  
Размер текста: 1 кБ  
Символов в тексте: 32977  
Слов в тексте: 3929  
Число предложений: 392

## ИНФОРМАЦИЯ ОБ ОТЧЕТЕ

Последний готовый отчет (ред.)  
Начало проверки: 20.06.2020 07:22:31  
Длительность проверки: 00:00:03  
Комментарии: не указано  
Модули поиска: Модуль поиска Интернет



### ЗАИМСТВОВАНИЯ

13,05%

### САМОЦИТИРОВАНИЯ

0%

### ЦИТИРОВАНИЯ

0%

### ОРИГИНАЛЬНОСТЬ

86,95%

Заимствования — доля всех найденных текстовых пересечений, за исключением тех, которые система отнесла к цитированиям, по отношению к общему объему документа.  
Самоцитирования — доля фрагментов текста проверяемого документа, совпадающий или почти совпадающий с фрагментом текста источника, автором или соавтором которого является автор проверяемого документа, по отношению к общему объему документа.

Цитирования — доля текстовых пересечений, которые не являются авторскими, но система посчитала их использование корректным, по отношению к общему объему документа. Сюда относятся оформленные по ГОСТу цитаты; общеупотребительные выражения; фрагменты текста, найденные в источниках из коллекций нормативно-правовой документации.

Текстовое пересечение — фрагмент текста проверяемого документа, совпадающий или почти совпадающий с фрагментом текста источника.

Источник — документ, проиндексированный в системе и содержащийся в модуле поиска, по которому проводится проверка.

Оригинальность — доля фрагментов текста проверяемого документа, не обнаруженных ни в одном источнике, по которым шла проверка, по отношению к общему объему документа.

Заимствования, самоцитирования, цитирования и оригинальность являются отдельными показателями и в сумме дают 100%, что соответствует всему тексту проверяемого документа.

Обращаем Ваше внимание, что система находит текстовые пересечения проверяемого документа с проиндексированными в системе текстовыми источниками. При этом система является вспомогательным инструментом, определение корректности и правомерности заимствований или цитирований, а также авторства текстовых фрагментов проверяемого документа остается в компетенции проверяющего.

№	Доля в отчете	Источник	Ссылка	Актуален на	Модуль поиска
[01]	3,49%	[Advances in Microbial Physiology] Volume 66    A Post-Genomic View of th...	<a href="https://doi.org">https://doi.org</a>	22 Авг 2019	Модуль поиска Интернет
[02]	0%	Recherche et caractérisation de microorganismes dans les compartiments g...	<a href="https://tel.archives-ouvertes.fr">https://tel.archives-ouvertes.fr</a>	05 Мая 2020	Модуль поиска Интернет
[03]	1,45%	<a href="http://www.bio.msu.ru/res/Dissertation/696/DISSERTATION_FILENAME/Korn...">http://www.bio.msu.ru/res/Dissertation/696/DISSERTATION_FILENAME/Korn...</a>	<a href="http://bio.msu.ru">http://bio.msu.ru</a>	04 Авг 2017	Модуль поиска Интернет

Еще источников: 17

Еще заимствований: 8,11%