

# Growth patterns of bacterial cultures depending on the nitrogen availability



Kan G.V.\*, Suslova M.Yu., Tikhonova I.V., Lipko I.A., Belykh O.I.

Limnological Institute Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Ulan-Batorskaya Str., 3, Irkutsk, 664033, Russia

**ABSTRACT.** Morphological and ultrastructural growth patterns of bacterial cultures in response to the nitrogen availability were demonstrated using cultivation and scanning electron microscopy (SEM). It was found that strains of *Pseudomonas* sp. 1CB and *Streptomyces* sp. 21A are able to grow only in the medium with available nitrogen. *Rhizobium* sp. 2A formed biofilm on glass in medium with nitrate and in medium without available nitrogen. In a non-nitrogenous medium, an increase in the diameter of bacterial cells was observed due to the intensive secretion of polysaccharide mucus, which can be considered a mechanism of protection of the nitrogenase complex from the damaging effect of oxygen.

**Keywords:** nitrogen, nitrogen-fixation, *Rhizobium*, scanning electron microscopy, Lake Baikal

**For citation:** Kan G.V., Suslova M.Yu., Tikhonova I.V., Lipko I.A., Belykh O.I. Growth patterns of bacterial cultures depending on the nitrogen availability // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - P. 925-930. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-925

## 1. Introduction

One of the main nutrients limiting the growth of bacteria in water bodies is nitrogen. To maintain metabolism, microorganisms use dissolved inorganic nitrogen, such as nitrate or nitrite, which is reduced to ammonium and then is involved in a central nitrogen assimilation pathway known as the glutamine synthetase/glutamate synthase cycle (Casciotti, 2016). In oligotrophic waters, an important source of nitrogen is urea, an organic compound, a co-product of cellular metabolism or the decomposition of dead biomass. Cyanobacteria and heterotrophic bacteria are known to produce urea, and representatives of some genera are able to hydrolyze it with the urease enzyme to a more highly digestible form, ammonium (Collier et al., 2009; Solomon et al., 2010). Biological nitrogen-fixation is also one of the sources of nitrogen in oligotrophic waters (Montoya et al., 2004). The reduction of molecular nitrogen to ammonia is catalyzed by the enzyme complex nitrogenase. Nitrogenase is sensitive to the action of oxygen, which not only inhibits the process of nitrogen fixation but can also prevent the synthesis of the enzyme itself. In some cyanobacteria, fixation of molecular nitrogen occurs in specialized cells with a thick cell wall, heterocysts, and free-living heterotrophic nitrogen-fixing organisms have unique biochemi-

cal and morphological mechanisms that protect nitrogenase from oxygen (Sabra et al., 2000; Bertsova et al., 2005).

The aim of this work is to experimentally determine the effect of nitrogen source on the growth of bacterial cultures.

## 2. Materials and methods

Pure cultures of strains isolated from Lake Baikal were used: *Rhizobium* sp. 2A (*Alphaproteobacteria*; *Hyphomicrobiales*), *Pseudomonas* sp. 1CB (*Gammaproteobacteria*; *Pseudomonadales*), and *Streptomyces* sp. 21A (*Actinomycetes*; *Kitasatosporales*). *Rhizobium* sp. 2A strain was isolated on nitrogen-free Ashby's medium from surface water microlayer; *Pseudomonas* sp. 1CB was isolated on Giltay medium from epilithic biofilm; and *Streptomyces* sp. 21A was isolated on RPA/10 medium from sponge bodies. The genome of *Streptomyces* sp. 21A includes genes encoding the synthesis of enzymes involved in the assimilative reduction of nitrate to ammonium. In the genome of *Pseudomonas* sp. 1CB, genes *narG*, *nirS*, *norB*, and *nosZ*, encoding enzymes necessary for complete denitrification, as well as genes responsible for the synthesis of enzymes for the dissimilatory reduction of nitrate to ammonium were identified (*nirBD*).

\*Corresponding author.

E-mail address: [podlesnaya@lin.irk.ru](mailto:podlesnaya@lin.irk.ru) (G.V. Kan)

**Received:** August 01, 2024; **Accepted:** August 21, 2024;

**Available online:** August 30, 2024

© Author(s) 2024. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.



The strains were seeded on a solid R2A medium and cultured for 5 days at room temperature. Then the grown cell biomass was transferred by inoculation loop into 5 ml of sterile Baikal water and mixed thoroughly. Two variants of liquid Ashby's medium were prepared, each containing 60 ml of saccharose in 100 ml flasks: nitrogen-free and with the addition of 1 g/L  $\text{KNO}_3$ . The prepared media were seeded with a suspension of cells in an amount of 2 ml of the tested strains, mixed, and 25 ml was added to each sterile Petri dish with coverslips. Control Petri dishes with coverslips were filled with sterile medium.

Cultivation was carried out at 22-24°C for 7 days. Results were obtained in two replicates on 3, 5, and 7 days of cultivation. The coverslips were removed from the medium with sterile forceps, washed in sterile water, and prepared for scanning electron microscopy. Samples on coverslips were fixed for one hour with a 2.5% glutaric aldehyde solution in phosphate buffer. The solution was then dehydrated in a series of alcohols of ascending concentration (30% for 10 minutes, 50% for 10 minutes, 70% for 10 minutes, and 96% for 10 minutes), followed by drying in a thermostat at 65°C. The coverslips were adhered to the table with double-sided tape, gilded, and examined under an FEI Company Quanta 200 scanning electron microscope ("FEI Company", USA).

### 3. Results and discussion

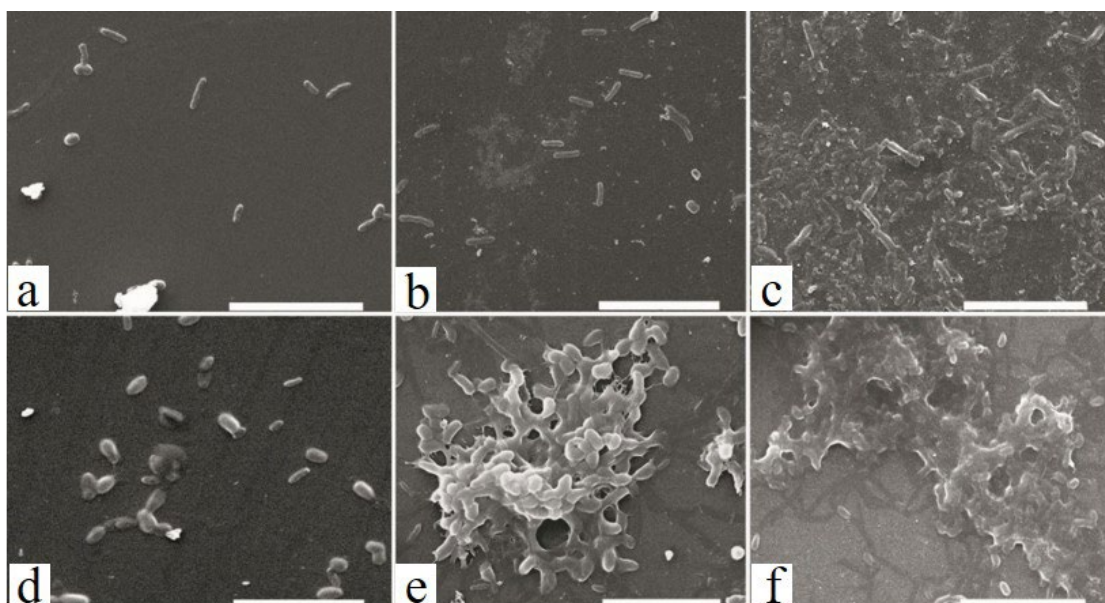
Scanning electron microscopy was used to reveal the growth patterns of strains *Rhizobium* sp. 2A, *Pseudomonas* sp. 1CB, and *Streptomyces* sp. 21A depending on nitrogen availability.

The strain *Rhizobium* sp. 2A formed a biofilm on glass in medium with nitrate (Fig. 1 a-c) and in medium without available nitrogen (Fig. 1 d-e) during 7 days

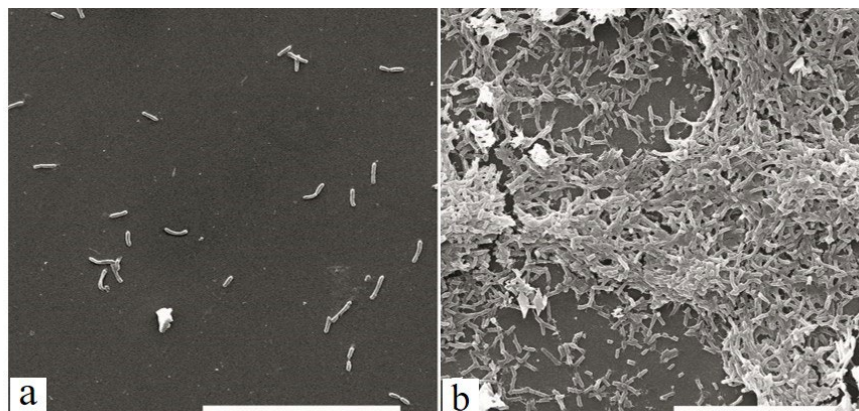
of cultivation. Microscopic observation in the medium without available nitrogen showed a 2-fold increase in the diameter of bacterial cells and more intensive secretion of polysaccharide mucus, which can be considered as a mechanism of protection of the nitrogenase complex from the damaging effect of oxygen. Thus, on the 7th day of cultivation, the cell diameter in the medium with nitrate was 0.75  $\mu\text{m}$  (SD=0.13), without nitrogen was 1.50  $\mu\text{m}$  (SD=0.16). Cell length did not change significantly and was 2.76  $\mu\text{m}$  (SD=0.72) and 2.64  $\mu\text{m}$  (SD=0.41), respectively.

Many nitrogen-fixing bacteria are known to be unable to assimilate  $\text{N}_2$  under conditions of high content of  $\text{O}_2$  in environment. Exceptions are microorganisms with physiological or morphological characteristics that protect nitrogenase. For example, in *Azotobacter vinelandii*, the respiratory protection mechanism includes two physiological processes: an increase in the respiration rate and a decrease in the rate of oxygen diffusion into the cell (Sabra et al., 2000; Bertsova et al., 2005). In terms of morphological adaptations, *A. vinelandii* is characterized by the formation of a dense polysaccharide capsule around the cell, which is also found in *Rhizobium* sp. strain 2A. The presence of such a capsule leads to a significant increase in the thickness of the unmixed layer and a decrease in the diffusion coefficient within it. The rate of production of exopolysaccharides, the "building material" of the capsule, rises with increasing concentration of  $\text{O}_2$  and during the transition of culture to diazotrophic growth, i.e., under conditions when the respiratory protection mechanism is required (Sabra et al., 2000; Bertsova et al., 2005).

Strains of *Pseudomonas* sp. 1CB and *Streptomyces* sp. 21A formed a biofilm on glass only in the medium with nitrate (Fig. 2, Fig. 3); single bacterial cells were detected in the medium without nitrogen.



**Fig. 1.** Biofilm formation by *Rhizobium* sp. 2A. strain on 3 (a), 5 (b), and 7 (c) days of cultivation in medium with nitrate and on 3 (d), 5 (e), and 7 (f) days of cultivation in medium without an available nitrogen source. SEM. Scale: a-d - 10  $\mu\text{m}$ , e - 20  $\mu\text{m}$ .



**Fig.2.** Biofilm formation by *Pseudomonas* sp. 1CB in medium with nitrate at 3 (a) and 7 (b) days of cultivation. SEM. Scale - 20 µm.

#### 4. Conclusions

Thus, morphological changes were found in cells of the nitrogen-fixing culture of *Rhizobium* sp. 2A during the transition to diazotrophic growth. When the strain was cultured in nitrogen-free medium, i.e., when nitrogen fixation occurred, increased cell diameter and exopolysaccharide production were observed as evidence of adaptive mechanisms to protect nitrogenase from oxygen. Strains of *Pseudomonas* sp. 1CB and *Streptomyces* sp. 21A were able to grow only in medium with available nitrogen, converting soluble forms of inorganic nitrogen into organic nitrogen; in medium without nitrogen, the bacterial cells died within 7 days.

#### Acknowledgements

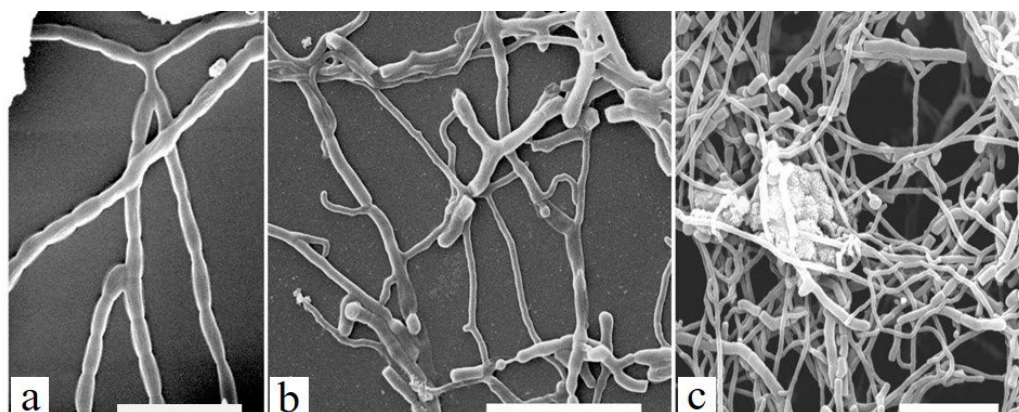
The study is carried out within the State Assignment No. 0279-2021-0015 (121032300269-9). The authors thank the staff of the “Electron Microscopy” instrumentation center of LIN SB RAS for the assistance.

#### Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

#### References

- Bertsova Yu.V., Demin O.V., Bogachev A.V. 2005. Respiratory protection of the nitrogenase complex in *Azotobacter vinelandii*. *Advances of Biological Chemistry* 45: 205–234.
- Casciotti K.L. 2016. Nitrogen and oxygen isotopic studies of the marine nitrogen cycle. *Annual Review of Marine Science*. 8: 379–407. DOI: [10.1146/annurev-marine-010213-135052](https://doi.org/10.1146/annurev-marine-010213-135052)
- Collier J.L., Baker K.M., Bell S.L. 2009. Diversity of urea-degrading microorganisms in open-ocean and estuarine planktonic communities. *Environmental Microbiology*. 11 (12): 3118–3131. DOI: [10.1111/j.1462-2920.2009.02016.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02016.x)
- Montoya J.P., Holl C.M., Zehr J.P. et al. 2004. High rates of N<sub>2</sub> fixation by unicellular diaotrophs in the oligotrophic Pacific Ocean. *Nature* 430: 1027–1032. DOI: [10.1038/nature02824](https://doi.org/10.1038/nature02824)
- Sabra W., Zeng A.-P., Lünsdorf H. 2000. Effect of oxygen on formation and structure of *Azotobacter vinelandii* alginate and its role in protecting nitrogenase. *Applied and Environmental Microbiology*. 66 (9): 4037–4044. DOI: [10.1128/AEM.66.9.4037-4044.2000](https://doi.org/10.1128/AEM.66.9.4037-4044.2000)
- Solomon C.M., Collier J.L., Berg G.M. et al. 2010. Role of urea in microbial metabolism in aquatic systems: a biochemical and molecular review. *Aquatic Microbial Ecology*. 59 (1): 67–88. DOI: [10.3354/ame01390](https://doi.org/10.3354/ame01390)



**Fig.3.** Biofilm formation by *Streptomyces* sp. 21A in medium with nitrate at 3 (a), 5 (b) and 7 (c) days of cultivation. SEM. Scale - 5 µm.

# Особенности роста бактериальных культур в зависимости от доступности азота

Краткое сообщение

LIMNOLOGY  
FRESHWATER  
BIOLOGY

Кан Г.В.\*, Сулова М.Ю., Тихонова И.В., Липко И.А., Белых О.И.

Лимнологический институт Сибирского Отделения Российской Академии Наук, ул. Улан-Баторская, 3, Иркутск, 664033, Россия

**АННОТАЦИЯ.** С помощью культивирования и сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) показаны морфологические и ультраструктурные особенности роста бактериальных культур в зависимости от доступности азота. Установлено, что штаммы *Pseudomonas* sp. 1СБ и *Streptomyces* sp. 21А способны к росту только в среде с доступным азотом. *Rhizobium* sp. 2А формировал биопленку на стекле в среде с нитратом и в среде без доступного азота. В безазотистой среде отмечали увеличение диаметра клеток бактерии за счет интенсивного образования полисахаридной слизи, что можно рассматривать как механизм защиты нитрогеназного комплекса от повреждающего действия кислорода.

**Ключевые слова:** азот, азотфиксация, *Rhizobium*, сканирующая электронная микроскопия, озеро Байкал

Для цитирования: Кан Г.В., Сулова М.Ю., Тихонова И.В., Липко И.А., Белых О.И. Особенности роста бактериальных культур в зависимости от доступности азота // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - С. 925-930. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-925

## 1. Введение

Одним из основных биогенных элементов, ограничивающих рост бактерий в водоемах, является азот. Для поддержания метаболизма микроорганизмы используют растворенный неорганический азот, например, нитрат или нитрит, который восстанавливается до аммония, а затем вступает в центральный путь ассимиляции азота, известный как цикл глутаминсинтетазы/глутаматсинтазы (Casciotti, 2016). В олиготрофных водах важным источником азота является мочевины – органическое соединение, побочный продукт клеточного метаболизма или разложения отмершей биомассы. Известно, что цианобактерии и гетеротрофные бактерии продуцируют мочевины, а представители некоторых родов способны гидролизовать ее с помощью фермента уреазы до более легкоусвояемой формы – аммония (Collier et al., 2009; Solomon et al., 2010). Биологическая азотфиксация также является одним из источников азота в олиготрофных водах (Montoya et al., 2004). Восстановление молекулярного азота в аммиак катализируется ферментным комплексом нитрогеназы. Нитрогеназа чувствительна к действию кислорода, который не только ингибирует процесс фиксации азота, но может препятствовать синтезу самого фермента. У некоторых

цианобактерий усвоение молекулярного азота происходит в специализированных клетках с толстой клеточной стенкой – гетероцистах, а у свободноживущих гетеротрофных азотфиксаторов существуют уникальные биохимические и морфологические механизмы, защищающие нитрогеназу от кислорода (Sabra et al., 2000; Берцова и др., 2005).

Цель данной работы – экспериментально определить влияние источника азота на рост бактериальных культур.

## 2. Материалы и методы

Использовали чистые культуры штаммов, выделенные из оз. Байкал: *Rhizobium* sp. 2А (*Alphaproteobacteria*; *Hyphomicrobiales*), *Pseudomonas* sp. 1СБ (*Gamma*proteobacteria; *Pseudomonadales*) и *Streptomyces* sp. 21А (*Actinomycetes*; *Kitasatosporales*). Штамм *Rhizobium* sp. 2А изолирован на безазотистой среде Эшби из проб поверхностного микрослоя воды, *Pseudomonas* sp. 1СБ на среде Гильята из эпиплитной биопленки, *Streptomyces* sp. 21А на среде РПА/10 из тела губки. Геном *Streptomyces* sp. 21А включает гены, кодирующие синтез ферментов, осуществляющих ассимиляционное восстановление нитратов до аммония. В геноме *Pseudomonas* sp. 1СБ выявлены гены *narG*, *nirS*, *norB*, *nosZ*, кодирующие

\*Автор для переписки.

Адрес e-mail: [podlesnaya@lin.irk.ru](mailto:podlesnaya@lin.irk.ru) (Г.В. Кан)

Поступила: 01 августа 2024; Принята: 21 августа 2024;  
Опубликована online: 30 августа 2024

© Автор(ы) 2024. Эта работа распространяется под международной лицензией Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.



ферменты, необходимые для осуществления полной денитрификации, а также гены, ответственные за синтез ферментов диссимиляционного восстановления нитрата до аммония (*nirBD*).

Штаммы высевали на твердую среду R2A и культивировали в течение 5 суток при комнатной температуре. Затем выращенную клеточную биомассу бактериальной петлей переносили в 5 мл стерильной байкальской воды и тщательно перемешивали. Готовили два варианта жидкой среды Эшби с сахарозой по 60 мл в колбах на 100 мл: безазотистую и с добавлением  $\text{KNO}_3$  – 1 г/л. Приготовленные среды засеивали 2 мл суспензии клеток исследуемых штаммов, перемешивали и вносили по 25 мл в стерильные чашки Петри с покровными стеклами. Контрольные чашки Петри со стеклами заливали стерильной средой.

Культивирование проводили при 22-24°C в течение 7 суток. Результаты снимали в двух повторностях на 3, 5, 7 сутки культивирования. Стекла извлекали из среды стерильным пинцетом, отмывали в стерильной воде и подготавливали для сканирующей электронной микроскопии. Образцы на стеклах фиксировали в течение одного часа 2,5%-ным раствором глутарового альдегида на фосфатном буфере, затем проводили обезвоживание препарата в серии спиртов восходящей концентрации (30% – 10 минут, 50% – 10 минут, 70% – 10 минут, 96% – 10 минут), после чего высушивали в термостате при 65°C. Стекла приклеивали к столику с помощью двустороннего скотча, напыляли золотом и просматривали в сканирующей электронной микроскоп FEI Company Quanta 200 («FEI Company», США).

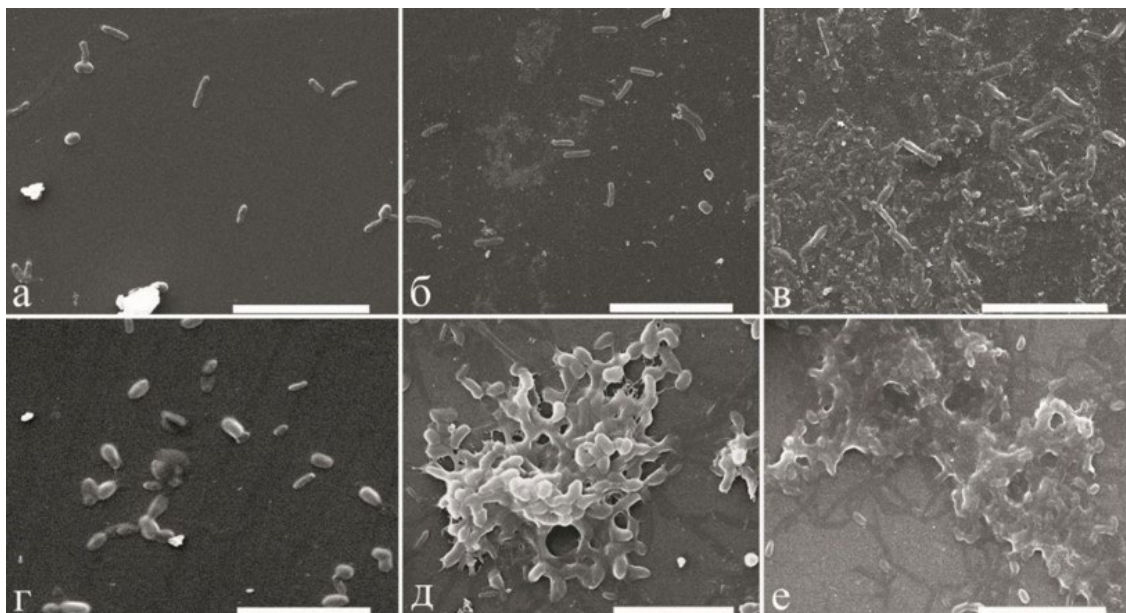
### 3. Результаты и обсуждение

С помощью сканирующей электронной микроскопии выявлены особенности роста штаммов *Rhizobium* sp. 2A, *Pseudomonas* sp. 1СБ и *Streptomyces*

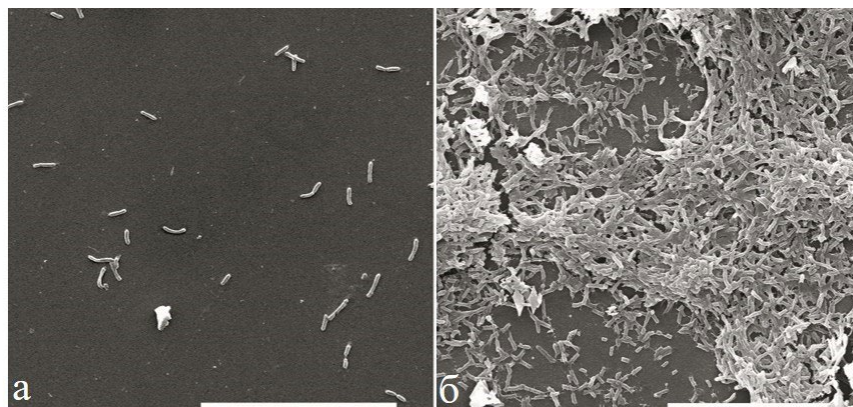
sp. 21A в зависимости от доступности азота.

Штамм *Rhizobium* sp. 2A формировал биопленку на стекле в среде с нитратом (Рис. 1 а-в) и в среде без доступного азота (Рис. 1 г-е) в течение 7 суток культивирования. При микроскопическом наблюдении в среде без доступного азота отмечали увеличение диаметра клеток бактерии в 2 раза и более интенсивное образование полисахаридной слизи, что можно рассматривать как механизм защиты нитрогеназного комплекса от повреждающего действия кислорода. Так на 7-е сутки культивирования диаметр клеток в среде с нитратом составил 0,75 мкм ( $SD=0,13$ ), без азота – 1,50 мкм ( $SD=0,16$ ). Длина клеток практически не изменялась и составила 2,76 мкм ( $SD=0,72$ ) и 2,64 мкм ( $SD=0,41$ ) соответственно.

Известно, что многие азотфиксирующие бактерии не способны ассимилировать  $\text{N}_2$  в условиях высокого содержания  $\text{O}_2$  в окружающей среде. Исключением являются микроорганизмы, способные защищать нитрогеназу благодаря физиологическим и морфологическим особенностям. К примеру, у *Azotobacter vinelandii* механизм дыхательной защиты состоит из двух физиологических процессов: увеличения скорости дыхания и уменьшения скорости диффузии кислорода в клетку (Sabra et al., 2000; Берцова и др., 2005). С точки зрения морфологических приспособлений для *A. vinelandii* характерно образование плотной полисахаридной капсулы вокруг клетки, что обнаружено и у штамма *Rhizobium* sp. 2A. Наличие такой капсулы приводит к значительному увеличению толщины не перемешиваемого слоя и понижению коэффициента диффузии внутри него. Скорость продукции экзополисахаридов – «строительного материала» капсулы – повышается при увеличении концентрации  $\text{O}_2$  и при переходе культуры к diaзотрофному росту, то есть в тех условиях, когда необходима реализация механизма дыхательной защиты (Sabra et al., 2000; Берцова и др., 2005).



**Рис.1.** Образование биопленки штаммом *Rhizobium* sp. 2A. на 3 (а), 5 (б), 7 (в) сутки культивирования в среде с нитратом и на 3 (г), 5 (д), 7 (е) сутки культивирования в среде без доступного источника азота. СЭМ. Масштаб: а-д – 10 мкм, е – 20 мкм.



**Рис.2.** Образование биопленки штаммом *Pseudomonas* sp. 1СБ в среде с нитратом на 3 (а) и 7 (б) сутки культивирования. СЭМ. Масштаб – 20 мкм.

Штаммы *Pseudomonas* sp. 1СБ и *Streptomyces* sp. 21А формировали биопленку на стекле только в среде с нитратом (Рис. 2, Рис. 3), в среде без азота обнаружены единичные клетки бактерий.

#### 4. Выводы

Таким образом, у клеток азотфиксирующей культуры *Rhizobium* sp. 2А при переходе к diazotrophic growth обнаружены морфологические изменения. При культивировании штамма в безазотистой среде, т.е. когда происходила фиксация азота, наблюдали увеличение диаметра клеток и продукции экзополисахарида как свидетельство наличия приспособительных механизмов защиты нитрогеназы от кислорода. Штаммы *Pseudomonas* sp. 1СБ и *Streptomyces* sp. 21А способны к росту только в среде с доступным азотом, осуществляя преобразование растворимых форм неорганического азота в органический, в среде без азота клетки бактерий погибали в течение 7 дней.

#### Благодарности

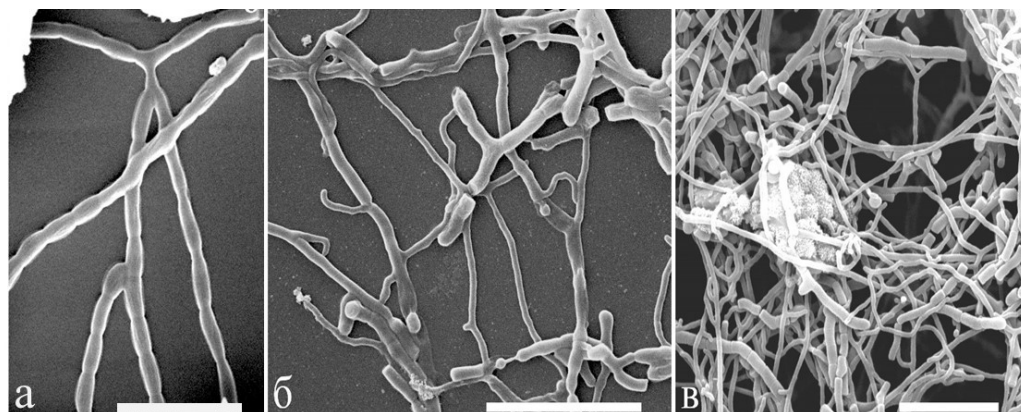
Работа выполнена в рамках темы государственного задания № 0279-2021-0015 (121032300269-9). Авторы выражают благодарность сотрудникам приборного центра ЛИН СО РАН «Электронная микроскопия» за помощь в проведении работы.

#### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### Список литературы

- Берцова Ю.В., Демин О.В., Богачев А.В. 2005. Дыхательная защита нитрогеназного комплекса у *Azotobacter vinelandii*. Успехи биологической химии 45: 205–234.
- Casciotti K.L. 2016. Nitrogen and oxygen isotopic studies of the marine nitrogen cycle. *Annual Review of Marine Science*. 8: 379–407. DOI: [10.1146/annurev-marine-010213-135052](https://doi.org/10.1146/annurev-marine-010213-135052)
- Collier J.L., Baker K.M., Bell S.L. 2009. Diversity of urea-degrading microorganisms in open-ocean and estuarine planktonic communities. *Environmental Microbiology*. 11 (12): 3118–3131. DOI: [10.1111/j.1462-2920.2009.02016.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02016.x)
- Montoya J.P., Holl C.M., Zehr J.P. et al. 2004. High rates of  $N_2$  fixation by unicellular diaotrophs in the oligotrophic Pacific Ocean. *Nature* 430: 1027–1032. DOI: [10.1038/nature02824](https://doi.org/10.1038/nature02824)
- Sabra W., Zeng A.-P., Lünsdorf H. 2000. Effect of oxygen on formation and structure of *Azotobacter vinelandii* alginate and its role in protecting nitrogenase. *Applied and Environmental Microbiology*. 66 (9): 4037–4044. DOI: [10.1128/AEM.66.9.4037-4044.2000](https://doi.org/10.1128/AEM.66.9.4037-4044.2000)
- Solomon C.M., Collier J.L., Berg G.M. et al. 2010. Role of urea in microbial metabolism in aquatic systems: a biochemical and molecular review. *Aquatic Microbial Ecology*. 59 (1): 67–88. DOI: [10.3354/ame01390](https://doi.org/10.3354/ame01390)



**Рис.3.** Образование биопленки штаммом *Streptomyces* sp. 21А в среде с нитратом на 3 (а), 5 (б) и 7 (в) сутки культивирования. СЭМ. Масштаб – 5 мкм.