

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ
Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

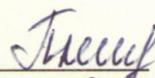
Кафедра биохимии и биофизики

Работа выполнена
на базе УНЦ физико-химической биологии
СГУ и ИБФРМ РАН

**ФЕНОЛОКСИДАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ РИЗОБАКТЕРИЙ
AZOSPIRILLUM BRASILENSE SR80 В РАЗЛИЧНОМ
ФИЗИОЛОГИЧЕСКОМ СТАТУСЕ
АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ**

студентки 2-го курса 241 группы
направления 060401 Биология
биологического факультета
Миловой Оксаны Алексеевны

Научный руководитель:
профессор, д.б.н.


03.06.2019

Е.В. Плешакова

Научный консультант:
с.н.с. ИБФРМ РАН, к.б.н.


30.05.2019

М.А. Купряшина

Зав. кафедрой биохимии и биофизики,
д.б.н., профессор


03.06.2019

С.А. Коннова

Саратов 2019

Введение. На сегодняшний день по-прежнему остаются актуальными исследования бактерий рода *Azospirillum* в связи с их способностью к ассоциативному взаимодействию с высшими растениями. Бактерии рода *Azospirillum* – ассоциативные diaзотрофы, положительно влияющие на рост и развитие растения хозяина [1, 2]. Относительно недавно у азоспирилл была обнаружена способность к продукции фенолоксиляющих ферментов, а именно лакказ, тирозиназ и Mn-пероксидаз [3, 4]. Фенолоксидазы обладают уникальными кинетическими свойствами, позволяющими окислять широкий спектр ароматических веществ. Способность к продукции данных ферментов может быть связана с механизмами адаптации азоспирилл, так как известно, что на первых этапах взаимодействия с макропартнером им необходимо преодолеть токсичное действие вторичных метаболитов растений ароматической природы.

Азоспириллы имеют две фазы жизненного цикла: активную, сопряженную с вегетацией растения-хозяина, и фазу покоя, которую данные микроорганизмы переживают на семени. Учитывая то, что колонизация корней происходит в первые дни после прорастания зерновки и в условиях жесткой конкуренции, очевидно, что преимущество имеют те бактерии, которые быстро выходят из состояния покоя, и имеют ферментативный статус, позволяющий активнее адаптироваться к условиям ризосферы. Известно, что покоящиеся культуры, по сравнению с вегетативными, претерпевают ряд изменений, затрагивающие как морфологию клеток, так и их метаболическую активность, в связи с этим представляется актуальным сравнительное исследование способности азоспирилл к деструкции сложных ароматических соединений, например синтетических красителей, которыми в последние годы идет существенное загрязнение водных и земельных ресурсов.

В связи с вышеизложенным, целью настоящей работы явилось исследование фенолоксидазной активности азоспирилл, находящихся в

различном физиологическом статусе. Для реализации поставленной цели решались следующие задачи:

1. Получить и охарактеризовать покоящуюся культуру *A. brasilense* SR80.
2. Исследовать индукцию выхода дормантных клеток азоспирилл из состояния покоя.
3. Исследовать способность покоящейся и вышедшей из состояния покоя культуры *A. brasilense* SR80 к продукции внеклеточных Mn-пероксидаз, лакказ и тирозиназ.
4. Оценить уровень фенолоксидазной активности покоящейся и вышедшей из состояния покоя культуры *A. brasilense* SR80 при сокультивировании с растением-хозяином.
5. Исследовать способность вышедшей из состояния покоя культуры *A. brasilense* SR80 к биодеструкции красителей трифенилметанового ряда, на примере малахитового зеленого.

В качестве объекта исследования был выбран штамм *Azospirillum brasilense* SR80, выделенный из проростков яровой мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. сорта Саратовская 49.

Для получения покоящихся культур *A. brasilense* SR80 аликвоту вегетативной культуры вносили в физиологический раствор (0,9% NaCl), содержащий 4-н-гексилрезорцин и CuSO₄ в концентрации 0,3 мМ. Объем вносимого инокулята подбирали таким образом, чтобы покоящаяся культура содержала 10⁶ кл./мл. Для оценки колониеобразующей способности дормантных клеток использовали чашечный метод Коха. Возобновление роста покоящихся бактерий в свежей жидкой среде определяли по оптической плотности культур при длине волны 595 нм на спектрофотометре Spekol 221 («Carl Zeiss», Германия). В экспериментах по «оживлению» покоящихся азоспирилл вещества-индукторы (вода, АЗП, культуральная жидкость активно растущей культуры *A. brasilense* SR80) вносили в среду одновременно с инокулятом.

Внеклеточную ферментативную активность дормантных клеток, нарастающей культуры и вариантов, вышедших из состояния покоя, детектировали спектрофотометрически на приборе Spekol 221 («Carl Zeiss», Германия) с использованием специфических хромогенных субстратов. Для этого клетки осаждали 15 мин при 7000 g на центрифуге К-24 («MLV», ГДР), супернатант использовали для определения внеклеточной активности ферментов. За единицу активности принимали количество фермента, катализирующего превращение 1 μ М субстрата за 1 мин. Удельную активность выражали в единицах на 1 мг белка. Содержание белка в пробах определяли по методу Бредфорд. Для исследования зависимости уровня активности фенолоксидаз дормантных клеток, нарастающей культуры и вариантов, вышедших из состояния покоя от присутствия растения хозяина, проводили инокуляцию трехсуточных стерильных проростков пшеницы сорта Саратовская 29 с последующим сокультивированием в течение 4 недель на среде для выращивания растений.

Магистерская работа состоит из введения, 3 глав (обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследований и их обсуждение), заключения, выводов, списка цитированной литературы. Список литературы включает 174 источника на русском и английском языках. Работа изложена на 66 страницах машинописного текста.

Научная новизна и значимость работы: с использованием комплекса стрессовых факторов получена и частично охарактеризована покоящаяся культура *A. brasilense* SR80, выявлены данные об индукции выхода культуры из дормантного состояния. Впервые в покоящейся и вышедшей из состояния покоя культуре *A. brasilense* SR80 выявлена активность внеклеточной Mn-пероксидазы, лакказы и тирозиназы. Обнаружена фенолоксидазная активность в среде выращивания покоящихся и вышедших из состояния покоя культур *A. brasilense* SR80 при сокультивировании с растением-хозяином. В ходе работы выявлена способность культуры *A. brasilense* SR80, вышедшей из состояния покоя, к биодegradации малахитового зеленого.

Полученные в рамках настоящей работы результаты исследований расширяют и углубляют представления об адаптивных возможностях азоспирилл и вносят дополнительные изменения в понимание механизмов растительно-бактериальных взаимодействий.

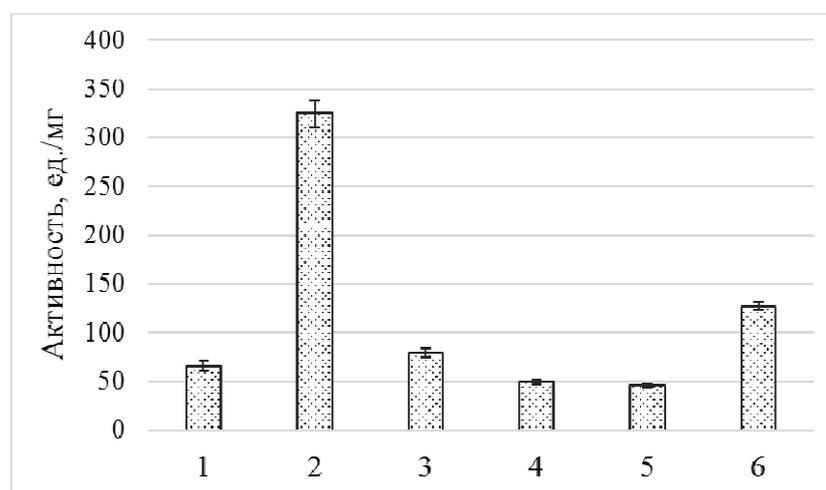
Основное содержание работы. У микроорганизмов в состоянии покоя, как и при выходе из него меняется не только морфология, но и метаболическая активность. На наш взгляд представилось важным проанализировать уровень ферментативной активности вышедших из состояния покоя культур при дальнейшем выращивании. В связи с этим активность фенолоксидаз также была проанализирована в образцах, в которых в качестве инокулята использовали вышедшие из состояния покоя клетки.

У всех взятых в эксперимент культур нам удалось детектировать присутствие внеклеточной Mn-пероксидазы. Выяснилось, что у ушедших в покой клеток также обнаруживалась активность Mn-пероксидазы, при этом уровень ферментативной активности был аналогичен активности нарастающей культуры. У культуры, вышедшей из состояния покоя, Mn-пероксидазная активность резко возрастала. У клеток, возобновивших свой рост после внесения культуральной жидкости, ферментативная активность увеличилась более чем в 17 раз. В то же время при втором пассаже вышедших из состояния покоя клеток уровень ферментативной активности снижался и был немногим выше Mn-пероксидазной активности покоящейся культуры. Полученные данные косвенно подтверждают предположение значимости данного фермента в адаптационном потенциале азоспирилл. Высокий уровень Mn-пероксидазной активности у культур, вышедших из состояния покоя, повышает уровень конкурентоспособности бактерий в жестких условиях ризосферы.

Исследование лакказной активности культур *A. brasilense* SR80, не показало аналогичного увеличения продукции у вышедших из состояния покоя клеток. Уровень активности внеклеточной лакказы практически не

отличался у нарастающей, покоящейся и возобновившей рост культуры. Однако происходило увеличение ферментативной активности на более чем 50% при переносе вышедших из состояния покоя клеток на свежую СМС. С чем связано подобное изменение в ферментативном статусе бактерий, сложно предположить.

Интересные результаты были получены при исследовании продукции тирозиназы клетками *A. brasilense* SR80, находящимися в различном физиологическом состоянии (рисунок 1). Наибольшие значения активности внеклеточной тирозиназы были детектированы для покоящихся культур, при этом удельная активность была как минимум вдвое больше, по сравнению с другими взятыми в эксперимент образцами.



1 – нарастающая культура; 2 – ЖНК; 3 – культура, возобновившая рост, индукция культуральной жидкостью; 4 – культура, возобновившая рост, индукция АЗП; 5 – второй пассаж после возобновления роста с культуральной жидкостью; 6 – второй пассаж после возобновления роста с АЗП

Рисунок 1– Тирозиназная активность бактерий рода *A. brasilense* SR80

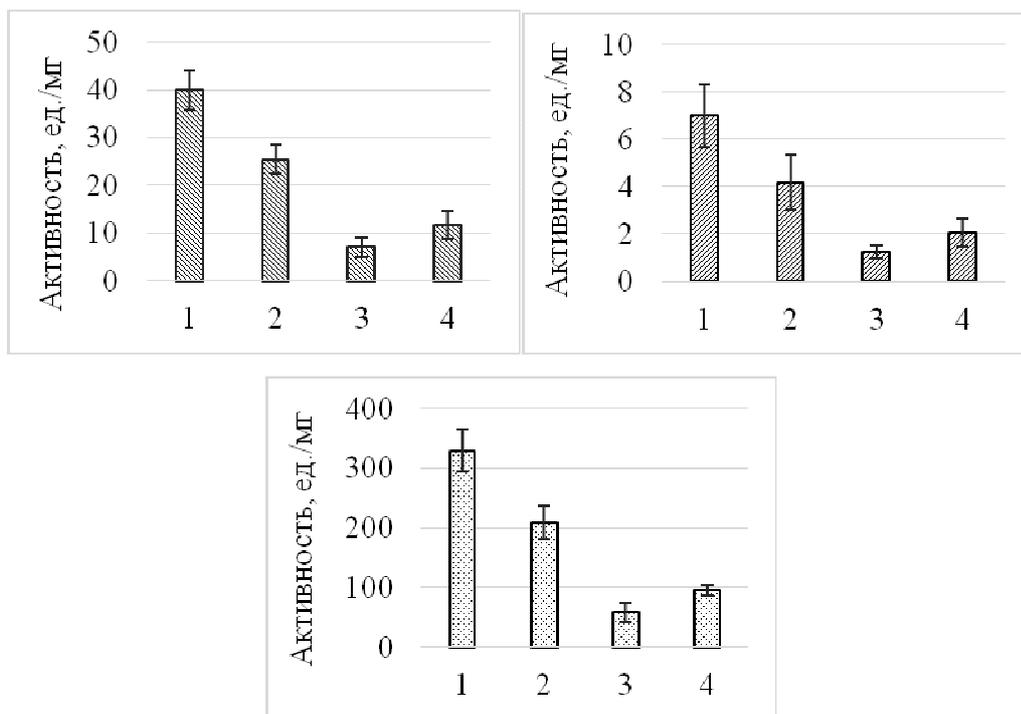
На первый взгляд полученные данные явно противоречат самому определению состояния покоя. Однако известно, что способность к продукции тирозиназы многих грибов, так и бактерий связывают с образованием меланина и меланиноподобных пигментов [5, 6]. А при исследовании ЖНК *A. brasilense* SR80 нами было отмечено, что культура

была визуально прозрачной, но содержала мелкодисперсный осадок коричневого цвета. Вероятнее всего высокий уровень тирозиназной активности дормантной культуры *A. brasilense* SR80 связан с продукцией и накоплением пигментов. Таким образом, в ходе проведенного исследования нам удалось детектировать активность внеклеточной Mn-пероксидазы, лакказы и тирозиназы у покоящейся и вышедшей из состояния покоя культуры *A. brasilense* SR80.

Основываясь на обнаружении ключевых ферментов фенолоксидазного комплекса в дормантных и вышедших из состояния покоя культурах штамма *A. brasilense* SR80, а также учитывая, что данные ферменты участвуют в механизмах адаптации бактерий к токсическому действию фенольных соединений при становлении растительно-микробной ассоциации, следующим этапом нашей работы явилось исследование уровня фенолоксидазной активности у покоящихся и возобновивших рост культур при сокультивировании с растением-хозяином. Для верной интерпретации полученных нами данных в качестве биологического контроля мы использовали инокулированные растения.

Как видно из представленных данных (рисунок 2), у всех взятых в эксперимент культур нам удалось детектировать присутствие внеклеточной Mn-пероксидазы, лакказы и тирозиназы. При исследовании фенолоксидазной активности культур *A. brasilense* SR80 с растением-хозяином, мы отмечали аналогичную тенденцию в изменении уровня ферментативной активности во всех 3-х вариантах.

В результате проведенного эксперимента было выявлено, что в среде выращивания растений при инокуляции покоящимися клетками также обнаруживается активность Mn-пероксидазы, лакказы и тирозиназы, но при этом уровень ферментативной активности был меньше, чем у биологического контроля. Наибольшие значения активности внеклеточных ферментов были детектированы для нарастающей культуры.



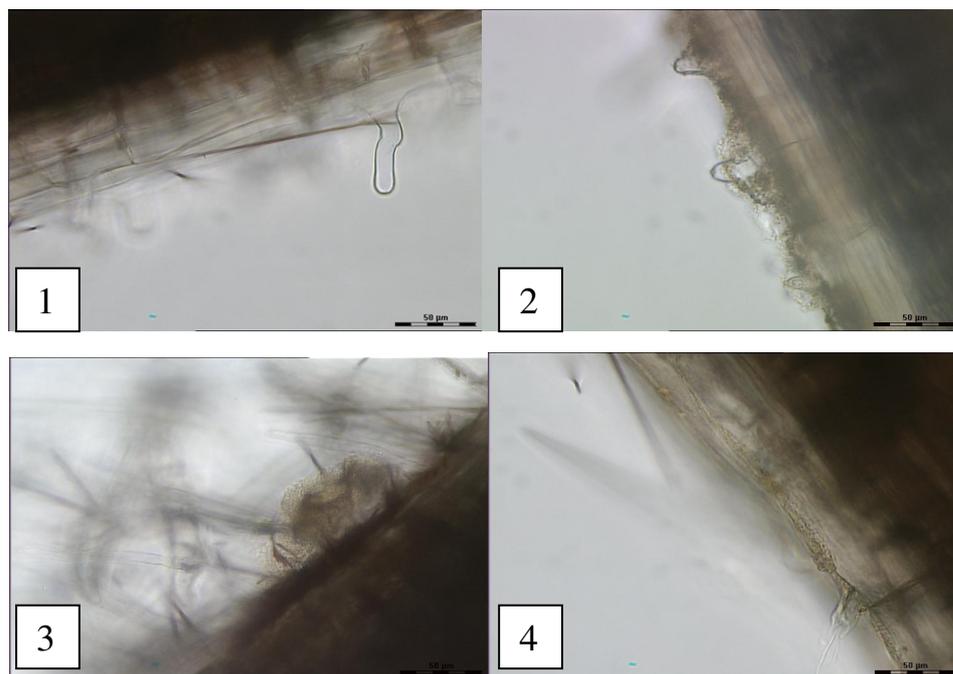
1 – нарастающая культура; 2 – культура, возобновившая рост; 3 – культура, находящаяся в покое; 4 – контроль

Рисунок 2 – Mn-пероксидазная (а), лакказная (б) и тирозиназная (в) активность бактерий рода *A. brasilense* SR80 при сокультивировании с растением-хозяином

Анализируя полученные данные, мы предположили, что при инокуляции проростков пшеницы дормантными клетками в данных условиях возможно не привела к выходу бактерий из состояния покоя. В связи с этим на следующем этапе работы для выявления бактериальных скоплений на поверхности корня исследуемые образцы, инокулированные культурами *A. brasilense* SR80 в различном физиологическом статусе, исследовали методом световой микроскопии с визуализацией кристаллическим фиолетовым.

С помощью световой микроскопии было выявлено, что во всех исследуемых образцах, кроме контроля, обнаруживались бактериальные скопления, окруженные матриксом, на поверхности корня, также клетки визуализировались в корневых волосках.

На следующем этапе исследования с применением световой микроскопии и окрашивания специфическими хромогенными субстратами на качественное обнаружение ферментов фенолоксидазного комплекса были получены микрофотографии скопления бактериальных клеток на поверхности корня пшеницы. На рисунке 3 видно, что зона бактериальных скоплений окрашивалась в желто-коричневый цвет, при использовании 2,6-диметоксифенола, что свидетельствует о накоплении ферментов в этой зоне, при этом данный факт отмечался для всех экспериментальных образцов, в том числе и для корней, инокулированных покоящимися культурами. В контрольных, неинокулированных образцах, подобной окраски не наблюдалось. В ходе проведенного исследования нам удалось детектировать активность внеклеточной Mn-пероксидазы, лакказы и тирозиназы у покоящейся и вышедшей из состояния покоя культуры *A. brasilense* SR80 при сокультивировании с пшеницей.



1 – контроль; 2 – нарастающая культура; 3 – культура, возобновившая рост;
4 – культура, находящаяся в покое

Рисунок 3 – Световая микроскопия; образец поверхности корня, инокулированного культурой *A. brasilense* SR80 (окраска 2,6-диметоксифенолом)

На следующем этапе эксперимента была проанализирована способность к биодеструкции красителей трифенилметанового ряда вышедшая из состояния покоя культура *A. brasilense* SR80. Культивирование бактерий проводилось на малатно-солевой среде, при пассаже бактерий вносили малахитовый зеленый в конечной концентрации 1 мМ; 0,1 мМ; 0,05 мМ и 0,01 мМ, в качестве инокулята использовались нарастающая культура и покоящиеся клетки. Степень обесцвечивания анализировали через 2–8 суток культивирования. Биодegradацию оценивали путем измерения оптической плотности, для этого бактериальную культуру осаждали центрифугированием, и супернатант использовали для анализа раствора при длине волны 600 нм. Также оценивали способность бесклеточных экстрактов нарастающей культуры, и культуры, вышедшей из состояния покоя к деградации аналогичных концентрации красителя. Степень разрушения красителя выражали в процентах.

Наиболее эффективное обесцвечивание малахитового зеленого планктонными клетками *A. brasilense* SR80 осуществлялось в концентрации 0,1 мМ. Внесение красителя в среду культивирования в конечной концентрации 1 мМ оказывало ингибирующее действие на рост бактерий как в активной стадии роста, так и при выходе из состояния покоя, степень деградации красителя составляла 0%. Данный факт может свидетельствовать о токсичном действии изучаемой концентрации трифенилметанового красителя в отношении азоспирилл. Максимальная деградация красителя достигалась на 8 сутки культивирования, при этом степень деградации малахитового зеленого вышедшими из состояния покоя клетками была выше, по сравнению с вегетативной нарастающей культурой, и достигала практически 100 %. На начальном этапе культивирования деструктивный потенциал выходящей из дормантного состояния культуры был ниже по сравнению с активно нарастающими клетками. Согласно опубликованным ранее данным, перенесение стадии покоя и выход из дормантного состояния

повышает деструктивный потенциал микроорганизмов в отношении различных ксенобиотиков и органополютантов [7].

Заключение:

1. С использованием комплекса стрессовых факторов получена и частично охарактеризована покоящаяся культура *A. brasilense* SR80, полностью утрачивающая колониобразующую способность, но возобновляющая рост в свежей жидкой среде при оптимальных условиях.

2. Показано, что внесение культуральной жидкости вегетативной культуры и агглютинина зародышей пшеницы вызывает индукцию выхода дормантной культуры *A. brasilense* SR80 из состояния покоя.

3. Впервые в покоящейся и вышедшей из состояния покоя культуре *A. brasilense* SR80 выявлена активность внеклеточной Mn-пероксидазы, лакказы и тирозиназы.

4. Установлено наличие фенолоксидаз в среде выращивания покоящихся и вышедших из состояния покоя культур *A. brasilense* SR80 при сокультивировании с растением-хозяином. Для дормантных клеток значения ферментативной активности были крайне низки.

5. Впервые выявлена способность вышедшей из состояния покоя культуры *A. brasilense* SR80 к биодegradации малахитового зеленого. Максимальная деградация красителя достигалась на 8 сутки культивирования, при этом степень деструкции была 99%.

Список использованных источников

1. Fibach-Paldi, S. Key physiological properties contributing to rhizosphere adaptation and plant growth promotion abilities of *Azospirillum brasilense* / S. Fibach-Paldi, S. Burdman, Y. Okon // FEMS Microbiol. Lett. – 2012. – V. 326. – P. 99–108.

2. *Azospirillum brasilense* produces the auxin-like phenylacetic acid by using the key enzyme for indole-3-acetic acid biosynthesis / E. Somers [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 2005. – V. 71. – P. 1803–1810.

3. Фенолоксидазная активность бактерий рода *Azospirillum* / В. Е. Никитина [и др.] // Микробиология. – 2010. – Т. 79, № 3. – С. 344–351.

4. Лигнин-пероксидаза фенолоксидазного комплекса ассоциативных бактерий *Azospirillum brasilense* / С. В. Петров [и др.] // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2014. – Т. 174, № 13. – С. 88–91.

5. Claus, H. Bacterial tyrosinases / H. Claus, H. Decker // System. Appl. Microbiol. – 2006. – V. 29. – P. 3–14.

6. Fungal tyrosinases: new prospects in molecular characteristics, bioengineering and biotechnological applications / S. Halaouli [et al.] // J. Appl. Microbiol. – 2006. – V. 100. – P. 219–232.

7. Drotaverine hydrochloride degradation using cyst-like dormant cells of *Rhodococcus ruber* / I. B. Ivshina [et al.] // Current Microbiol. – 2014. – V. 70, N 3. – P. 307–314.

