

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

Кафедра биохимии и биофизики

**ИЗМЕНЕНИЕ НЕКОТОРЫХ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ И
КУЛЬТУРАЛЬНЫХ СВОЙСТВ БАКТЕРИЙ
AZOSPIRILLUM BRASILENSE Sp245 ПОД ВЛИЯНИЕМ НЕКОТОРЫХ
СИНТЕТИЧЕСКИХ КУМАРИНОВ**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студента 4 курса 421 группы

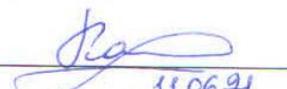
Направления подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология

Биологического факультета

Менухова Владислава Олеговича

Научный руководитель:

к.б.н.


11.06.21
дата, подпись

М.В. Каневский

Зав. кафедрой:

д.б.н., проф.


11.06.21
дата, подпись

С.А. Коннова

Саратов 2021

Введение. Проблема взаимодействия растений и микроорганизмов до сих пор актуальна ввиду того, что она до сих пор не изучена. Отдельное внимание уделяется моментам молекулярного диалога, в который вовлечены метаболиты и растений, и бактерий. Вещества фенольной природы, среди широкого спектра вторичных метаболитов растений, выделяемых в окружающую среду, занимают особое место. К ним относятся флавоноиды, кумарины, антоцианы, феноловые кислоты.

Кумарины являются важным классом природных полифенольных веществ, которые относятся к семейству бензопиранов. Они названы так в честь растения *Coumarouna odorata* (ныне *Dipteryx odorata*), из которого был выделен простейший представитель этого класса соединений.

Роль кумаринов в растительно-бактериальном взаимодействии не определена, несмотря на изученность их биологической активности.

Объект исследования – граммотрицательный микроорганизм *A. brasilense*, являющийся, на данный момент, одним из наиболее изученных и неприхотливых в выращивании, а также широко применяемый при исследовании растительно-бактериальных взаимодействий. Все представители данного рода являются ассоциативные diaзотрофными бактериями. В рамках данной работы использовался штамм *A. brasilense* Sp245.

Объект подвергался воздействию следующих синтетических кумаринов: 1-(2-оксо-2Н-хромен-3-ил)бутан-1,3-дион и 1-(7-гидрокси-2-оксо-2Н-хромен-3-ил)бутан-1,3-дион.

Цель работы – изучение влияния кумаринов на физико-химические и культуральные свойства бактерий *Azospirillum brasilense* Sp245.

Для достижения данной цели были поставлены и решались следующие задачи:

1. Определить наличие бактериостатического эффекта исследуемых кумаринов по отношению к *A. brasilense* Sp245.
2. Выяснить влияние кумаринов на электрооптические параметры суспензии *A. brasilense* Sp245.

3. Установить, приводит ли добавление кумаринов в среду культивирования бактерий к изменению антигенных свойств *A. brasilense* Sp245.

4. Изучить влияние исследуемых кумаринов на интенсивность продукции экстраклеточных полисахаридов бактериями *A. brasilense* Sp245.

Исследование проводилось с использованием методов, адекватных поставленным задачам. Производилось культивирование микроорганизмов в средах с добавлением исследуемых веществ. Количество жизнеспособных микроорганизмов подсчитывалось методом КОЕ. Оценка интенсивности роста культуры осуществлялась с помощью электрооптических методов. Культуральную жидкость отделяли от клеточной биомассы центрифугированием, полученный супернатант концентрировали на роторном испарителе. Измерение электрооптического сигнала проводилось на электрооптическом анализаторе ELUS. Также проводилось определение содержания углеводов в культуральной жидкости *Azospirillum brasilense* Sp245 путем фенол-серной реакции, и выделение капсульных и экстраклеточных гликополимеров.

Структура дипломной работы. Работа состоит из введения, основной части, выводов, заключения, списка использованных источников. Литературный обзор составлен на основе анализа 168 источников и включает в себя следующие вопросы: общие сведения о кумаринах (структура и классификация, выполняемые функции в растениях, области применения человеком, характеристика бактерий рода *Azospirillum*, роль бактериальных гликополимеров в формировании растительно-бактериальных ассоциаций).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В работе были использованы бактерии рода *Azospirillum*, предоставленные коллекцией микроорганизмов ИБФРМ РАН.

Грамотрицательные микроорганизмы *A. brasilense* Sp245 выделены из ризосферы пшеницы *Triticum vulgare* (Бразилия).

В работе использовались синтетические кумарины: 1-(2-оксо-2Н-хромен-3-ил)бутан-1,3-дион (далее кумарин 1) и 1-(7-гидрокси-2-оксо-2Н-хромен-3-ил)бутан-1,3-дион (далее кумарин 2).

Исследуемые бактерии культивировались в жидкой синтетической малатно-солевой среде следующего состава: фосфатный буфер, малат натрия в качестве источника углерода и хлорид аммония в качестве источника азота. При помощи NaOH (4 г/л) реакцию среды доводили до pH 6,6-6,8. Непосредственно перед стерилизацией в среду добавляли раствор витаминов (тиамин, биотин, пиридоксаль) из расчета 1 мл на 1 л среды. В среду добавляли раствор хелата железа из расчета 10 мл на 1 л среды.

Среду стерилизовали 30 минут при 121 °С.

Кумарины растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО). Растворы кумаринов были добавлены в среду выращивания до внесения инокулята.

Исследуемые культуры были культивированы в колбах Эрленмейера при температуре 30 °С и постоянном перемешивании 200 об/мин на вибростенде до окончания экспоненциальной фазы роста.

На протяжении всего исследования культуры поддерживались на твердой среде всё того же состава с добавлением 1,8% агар-агара на чашках Петри при 4°С.

Измерение электроориентационных спектров *Azospirillum brasilense* Sp245 проводили при длине волны света 670 нм (относительно вакуума). Было установлено, что кумарин 1 обуславливает только снижение ЭО-сигнала суспензий клеток, выращенных в его присутствии, в то время как кумарин 2 в концентрации 200 мкМ вызывает увеличение этого показателя.

Оценка антибактериальной активности исследуемых флавоноидов осуществлялась посредством подсчета колониеобразующих единиц (КОЕ). Поскольку перед внесением в среду роста кумарины растворялись в ДМСО, необходимо было проверить, как ДМСО влияет на клетки азоспирилл. Для этого бактерии культивировались в течение суток в среде содержащей 1% ДМСО. Было установлено, что ДМСО (1% р-р в среде) незначительно (на

8%) снижал рост бактерий. Поэтому, в дальнейшем, в качестве контроля, использовалась культура, выращенная в среде с ДМСО. Результаты КОЕ бактерий, выращенных на среде с кумарином 1, достоверно не отличались от контроля при всех исследуемых концентрациях, хотя и были выше (на 8%). Действие кумарина 2 проявлялось в значительном и достоверном снижении роста до практически полного подавления, о чём свидетельствовало малое число КОЕ. Для концентраций 50, 100 и 200 мкМ было зарегистрировано снижение показателя КОЕ на 60, 85 и 99% соответственно. Рост азоспирилл в присутствии кумарина 2 в концентрации 200 мкМ не наблюдался, однако при высеве бактерий на чашки были обнаружены единичные колонии в количестве соответствующем КОЕ бактерий, взятых из колбы до начала роста. Это может свидетельствовать о бактериостатическом эффекте, но не бактерицидном (рисунок 1).

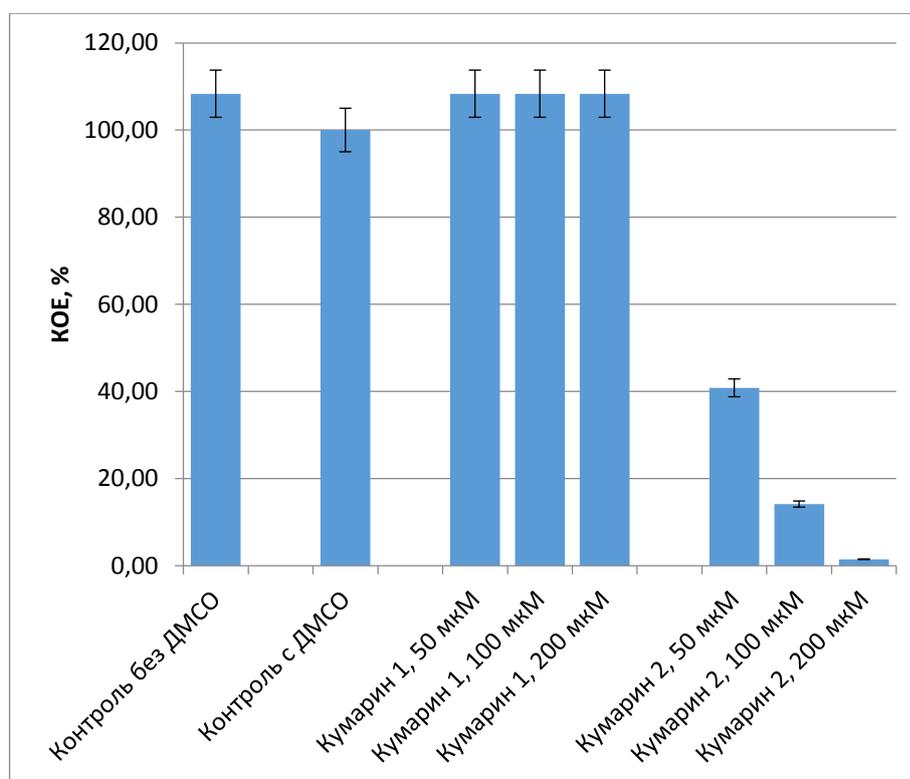


Рисунок 1 – Показатели КОЕ бактерий *A. brasilense* Sp245, выращенных в присутствии различных концентраций кумаринов

Действие фенольных соединений часто проявляется в изменении состава и структуры гликополимеров поверхности бактериальных клеток.

Поэтому для дальнейшей оценки наличия изменения ЛПС микробных клеток были использованы антитела, специфичные к ЛПС данного штамма.

При оценке действия кумаринов на исследуемые бактерии нами было показано, что антитела реагировали на клетки, выращенные в присутствии кумаринов так же, как и на интактные клетки (рисунок 2).

Таким образом, клетки азоспирилл были проверены на антигенную специфичность. Сравнение показало, что присутствие в среде кумаринов не приводит к изменению антигенной специфичности. Это может говорить о том, что структура ЛПС не изменилась.

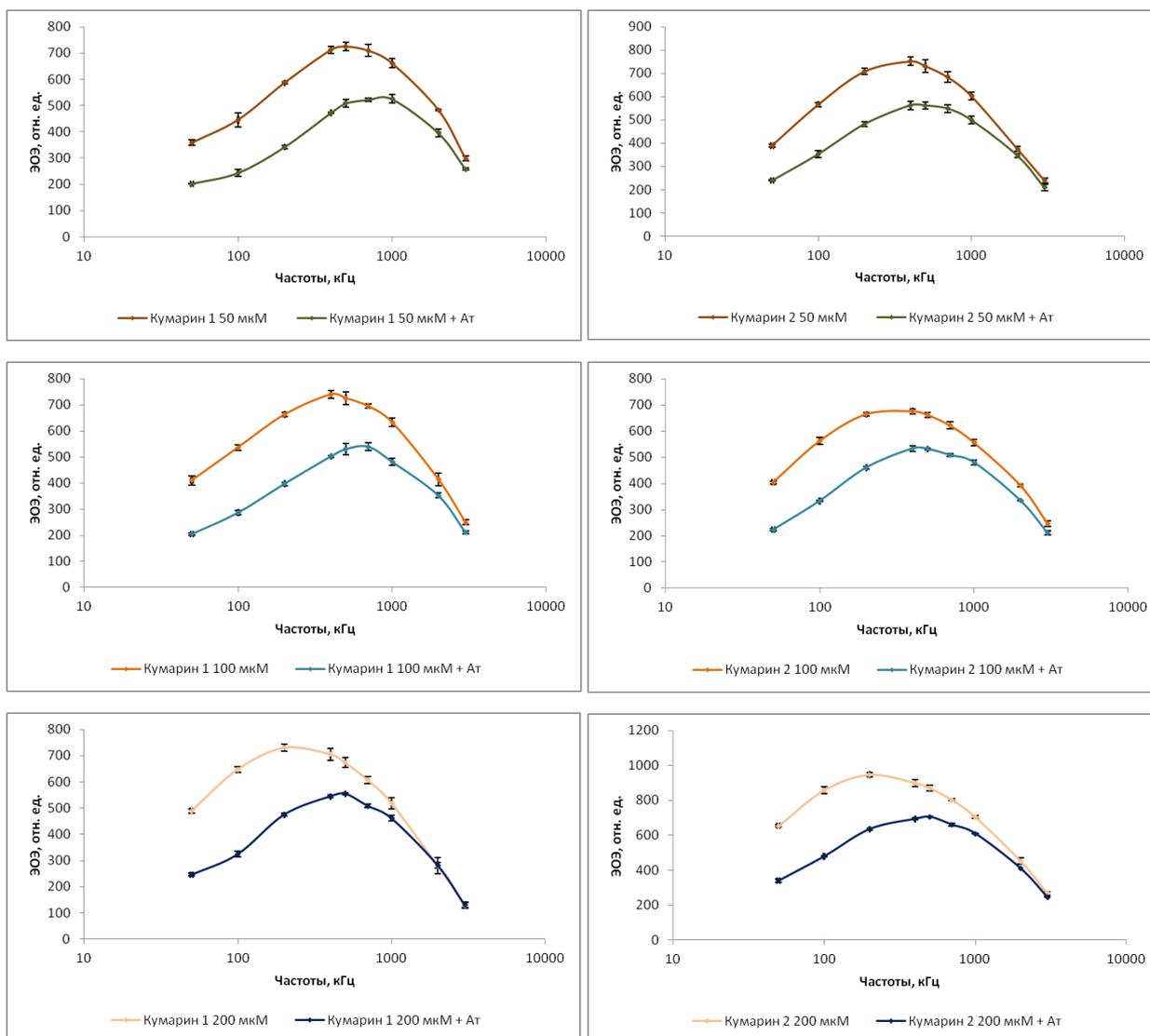


Рисунок 2 – Результаты ЭО-анализа клеточных суспензий с добавлением Ат_{Sp245} *A. brasilense* Sp245, выращенных в присутствии кумарина 1 (А,В,Д) и кумарина 2 (Б,Г,Е)

Вторичные метаболиты могут также влиять на выработку экстраклеточных полисахаридов. Культуральная жидкость, выращенных в присутствии кумаринов бактерий, отделялась от клеток путём центрифугирования и в дальнейшем анализировалась.

После экстракции и очистки препаратов ЭПС было установлено, что при культивировании *A. brasilense* Sp245 наблюдалось подавление синтеза капсульных полисахаридов бактериями. Возрастание количества ЭПС наблюдалось лишь в случае с концентрацией кумарина 2 в 50 мкМ. Поскольку в ходе очистки препаратов проводилась процедура диализа через полупроницаемые мембраны с пределом исключения 20 кДа, можно предположить, что отличия между полученными данными произошли из-за того, что все гликополимеры с молекулярной массой ниже 20 кДа были удалены в ходе диализа.

Анализ показал, что присутствие кумарина 1 в среде, во всех рабочих концентрациях (50, 100 и 200 мкМ), не приводило к достоверному изменению продукции экзополисахаридов бактериями в среду (рисунок 3). Таким образом, можно утверждать, что данное фенольное соединение не подходит для искусственного воспроизведения ризобиального симбиоза данного рода с корнями растений.

Однако количество ЭПС резко возрастало в средах с добавлением кумарина 2, при его концентрации 50 и 100 мкМ. В среде, с концентрацией данного соединения 200 мкМ, рост количества экзополисахаридов не был обнаружен.

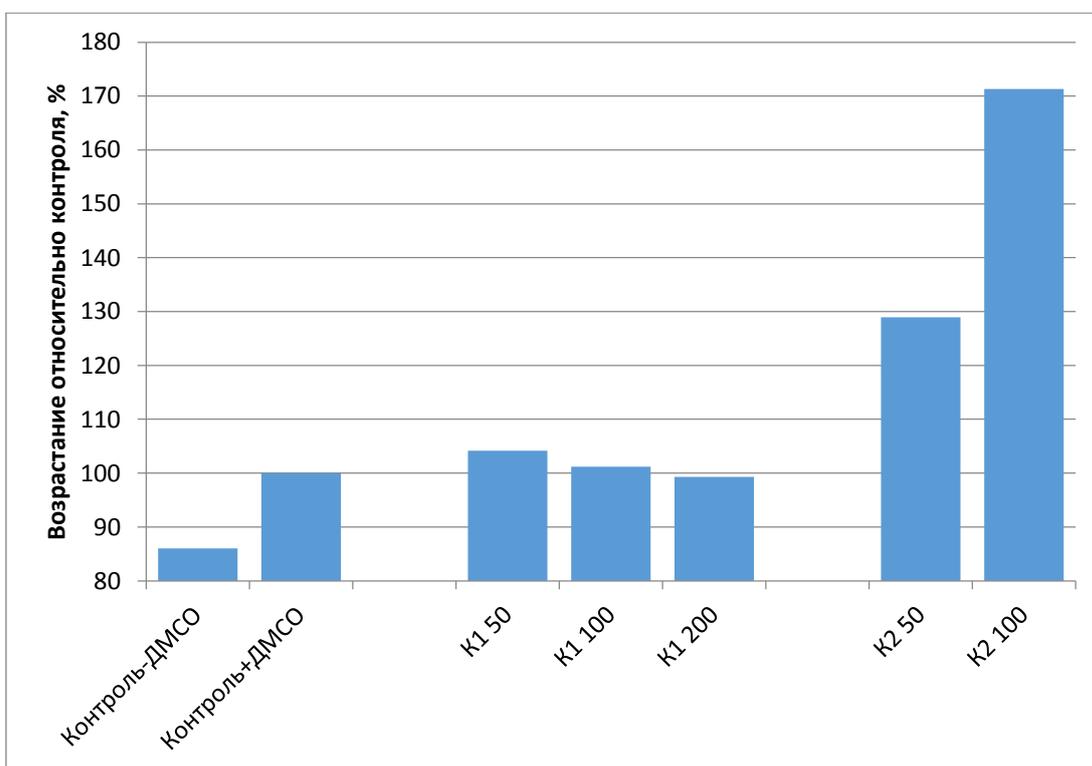


Рисунок 3 – сравнение продукции экзополисахаридов клетками *A. brasilense* Sp245, выращенных при всех рабочих концентрациях веществ

На рост биоплёнок *Azospirillum* существенно повлияли оба кумарина в рабочих концентрациях (рисунок 4). Относительно контроля, рост биоплёнок был значительным при концентрациях 100 и 200 мкМ/л кумарина 1 и при 200 мкМ/л кумарина 2.

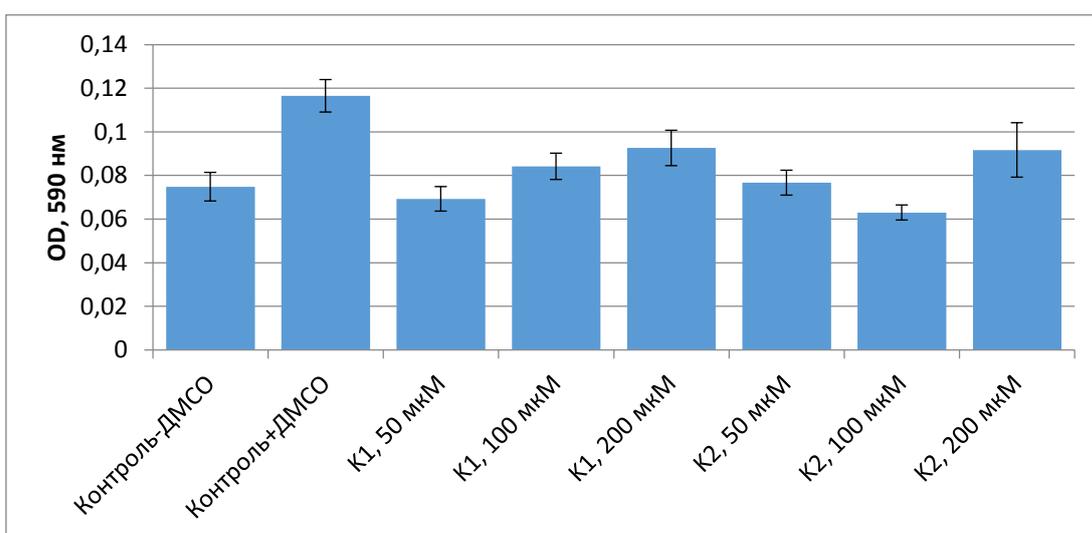


Рисунок 4 – сравнение роста биоплёнок *A. brasilense* Sp245, выращенных при всех рабочих концентрациях веществ

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Кумарины являются ключом к пониманию ризобиально-бактериального симбиоза. Возможность использовать их синтетические формы даёт шанс узнать большинство (если не все) процессов взаимодействия растений с факторами окружающей среды. А также иметь «рычаги» воздействия, как на сами растения, так и сопровождающие их развитие микроорганизмы, что в свою очередь открывает нам долгосрочную перспективу управления ростом и непосредственно метаболизмом растительных организмов в угоду запросам общества.

Результаты, продемонстрированные в данной работе, наглядно доказывают целесообразность продолжения изучения влияния синтетических кумаринов в этом направлении.

ВЫВОДЫ

1. Кумарин 1 не обладает бактериостатическими свойствами в диапазоне концентраций 50, 100 и 200 мкМ. Кумарин 2 приводит к снижению активности роста *A. brasilense* Sp245 на 60, 85 и 99% для концентраций 50, 10 и 200 мкМ соответственно

2. Кумарин 2 вызывает возрастание ЭО-сигнала в концентрации 200 мкМ. Кумарин 1 не приводит к изменению ЭО-сигнала в исследуемом диапазоне концентраций.

3. В концентрациях 50 и 100 мкМ кумарин 2name приводит к увеличению продукции экзополисахаридов штаммом *A. brasilense* Sp245.