

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н. Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра микробиологии и физиологии растений

**ВЛИЯНИЕ ГЕНА *flhD* НА ПОДВИЖНОСТЬ И СПОСОБНОСТЬ
ОБРАЗОВЫВАТЬ БИОПЛЕНКИ *AZOSPIRILLUM BALDANIORUM* Sp245
АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ**

студентки 4 курса 422 группы

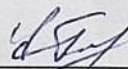
направления 06.03.01 Биология

Биологического факультета

Ждановой Софьи Сергеевны

Научный руководитель:

доцент, канд. биол. наук


6.06.25

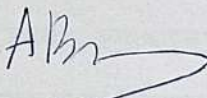
Е. В. Глинская

Научный консультант:

зав. лаб. генетики микроорганизмов

ИБФРМ РАН, вед. науч. сотр.,

д-р. биол. наук


6.06.25

А.В. Шелудько

Зав. кафедрой:

профессор, д-р. биол. наук


6.06.25

С. А. Степанов

Саратов 2025

Введение

Микроорганизмы, обитающие в ризосфере – тонком слое почвы, прилегающем к корням, образуют биопленки на поверхности корней колонизируемых ими растений. Процесс колонизации ризосферы состоит из 2 этапов: хемотаксиса (перемещение бактерий в ответ на корневые экссудаты) и процесса образования биопленки. Начальная фаза развития таких многоклеточных сообществ включает прикрепление бактерий к корням растений с помощью адгезинов и адгезивных структур, таких как жгутик [1].

Жгутики представляют собой сложные машины, собранные более чем из 30 белков. Ген *fliD* кодирует белок, образующий колпачок на конце формирующейся нити, и оказывает большое влияние на процессы хемотаксиса, адгезии, формирования биоплёнок и успешной колонизации корней [3]. В недавнем исследовании с использованием различных мутантных штаммов *Bacillus velezensis* было выявлено, что только мутанты с дефектом в гене *fliD* характеризовались выраженным снижением способности к адгезии на абиотических поверхностях, а также ризосферной колонизации [4]. Кроме того, при исследовании зоонозного и водного патогена *Aeromonas veronii* оказалось, что данный ген также влияет на вирулентность и играет важную роль в патогенности [5].

Эти данные свидетельствуют о многофункциональной роли гена *fliD* в жизнедеятельности различных бактериальных видов, как патогенных, так и ассоциированных с растениями. В связи с этим, актуальным является изучение функций данного гена у микроорганизмов, участвующих в колонизации корней и формировании симбиотических взаимодействий с растениями, в частности представителей группы PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) – микроорганизмов, способных стимулировать рост растений, выделяя различные биологически активные соединения, а также защищать растения от патогенной микрофлоры почв [6]. Многоклеточные сообщества, в частности биоплёнки,

образуемые азотфиксирующими бактериями, имеют большое значение для сельского хозяйства [7].

Одними из таких микроорганизмов являются бактерии рода *Azospirillum* – граммотрицательные бактерии, обладающие как полярными, так и латеральными жгутиками [8]. Они эффективно колонизируют корни злаковых растений, включая ризосферу пшеницы – одну из наиболее экономически значимых сельскохозяйственных культур России наряду с кукурузой и рисом [9]. В связи с этим, изучение генов, участвующих в процессе колонизации пшеницы, имеет важное прикладное значение.

Целью работы являлось определение влияния гена *fliD* на подвижность и способность к образованию биопленок *A. baldaniorum* Sp245.

Для реализации указанной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Создать генетическую конструкцию с мутацией в гене *fliD* и внедрить её в штамм *A. baldaniorum* Sp245.
2. Провести сравнительный анализ подвижности мутантного и дикого штаммов в жидких и полужидких средах.
3. Сравнить фенотип жгутикового аппарата у мутантного и дикого штаммов.
4. Оценить способность мутантного и дикого штаммов к формированию биопленок на абиотических поверхностях в жидкой среде.

Материал и методы

Объектом исследования служил дикий штамм *A. baldaniorum* Sp245, взятый из Коллекции ризосферных микроорганизмов Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН (ИБФРМ РАН). Также в работе для создания генетической конструкции использовали такие штаммы как *Escherichia coli* DH5α и *Escherichia coli* K802. Для создания генетической

конструкции использовали плазмиды pRK2013, pJET1.2/blunt, pUC4K, pEX18Tc.

A. baldaniorum выращивали на малатно-солевой среде с NH₄Cl (MSM) при температуре 28 °C, *E. coli* на среде Luria-Bertani (LB) при 37 °C [10].

Для введения чужеродной ДНК в бактериальную клетку использовали компетентные клетки, а их трансформацию проводили кальциевым методом [11].

В ходе создания мутантного штамма использовали метод ПЦР. Для его постановки использовали геномную ДНК, выделенную из жидких бактериальных культур с использованием набора GeneJET Genomic DNA Purification Kit (ThermoScientific, США). Для амплификации ДНК использовали готовую для употребления смесь экстра-микс для ПЦР HS-Taq PCR (Диаэм) или высокоточную ДНК полимеразу iProof High-Fidelity DNA Polymerase (Bio-Rad). Продукты ПЦР визуализировали с помощью электрофореза в гелях, содержащих 1 % агарозы и ТЕВ-буфер в стандартных условиях. Гидролиз ДНК эндонуклеазами рестрикции, разделение фрагментов ДНК в агарозном геле, лигирование ДНК, клонирование рекомбинантных ДНК в клетках *E. coli* осуществляли общепринятыми методами. Для анализа нуклеотидных последовательностей использовали базы данных и программы, представленные на серверах Национального центра биотехнологической информации США (NCBI).

Препаративный метод использовали для отделения необходимого чистого ДНК-сегмента от неспецифических продуктов и примесей после электрофореза.

Для перенесения созданной конструкции использовали метод трех родительского скрещивания [11]. Реципиентом служил дикий штамм бактерии *A. baldaniorum* Sp245. Донором – плазида pEX18Tc, несущая в себе конструкцию; она была помещена в штамм бактерии *E. coli* DH5α. Для ее мобилизации вводили плазмиду-помощницу pRK2013, которая была помещена в штамм бактерии *E. coli* K802.

Оценку подвижности микроорганизмов в жидкой и полужидкой средах проводили с помощью видеофиксации, осуществляемой на фазово-контрастном микроскопе.

Способность образовывать биопленки в жидкой среде исследовали в плоскодонных 96-луночных полистироловых планшетах и в стеклянных пробирках. 18-часовые жидкие культуры разводили до $ОП_{590} = 0,05-0,10$ в средах LB и МСС. После инкубирования среду сливали, а оставшиеся на стенках биопленки пробирки окрашивали 1 % водным раствором кристаллического фиолетового, затем краситель аккуратно смывали дистиллированной водой. Далее в пробирки добавляли этилового спирта и проводили оценку биомассы на спектрофотометре.

Бакалаврская работа включает содержание, введение, 3 главы (обзор литературы, материал и методы, результаты исследований), заключение, выводы и список использованных источников, включающий 49 источников на русском и английском языках. Работа изложена на 44 страницах машинописного текста. Работа проиллюстрирована 12 рисунками.

Основное содержание работы

Ген *fliD* локализован в плазмиде CDS Sp245p_22700 *A. baldaniorum* Sp245. Для получения мутантного штамма необходимо было прервать процесс считывания данного гена и его дальнейшую экспрессию. С этой целью в центральную часть гена была вставлена кассета Km-устойчивости, полученная из другой плазмиды.

При анализе нуклеотидной последовательности гена *fliD* был выбран центральный фрагмент размером 767 п.н. Данный сегмент содержит SalI сайт-рестрикции для вставки кассеты канамицин устойчивости, а также имеет запас порядка 200 п.н. с каждой стороны, необходимый для успешной гомологичной рекомбинации при трех родителем скрещивании.

Таким образом, первым этапом получения мутантного штамма стало

выделение и амплификация методом ПЦР центрального сегмента размером 767 п.н. плазмиды CDS Sp245p_22700 *A. baldaniorum* Sp245, который кодирует ген *fliD*.

Затем ампликон был интегрирован в векторе pJET1.2/blunt. Выбор данного вектора был обусловлен тем, что он подходит для работы с продуктами ПЦР с тупыми концами, одним из которых и представляет собой исследуемый ампликон, а также наличием летального гена, обеспечивающего положительный отбор трансформантов.

В результате было получено 4 клон плазмиды pJET1.2-p_22700, которые использовали для дальнейшего построения необходимой генетической конструкции. Для этого данные плазмиды были вырезаны из агарозного геля препаративным методом, очищены от него специальным набором в колонках и применены в следующем этапе.

Далее генетическая конструкция, созданная на основе вектора pJET1.2/blunt, была подвержена действию рестриктазы по SalI-сайту. В место разреза была вставлена кассета Km-устойчивости размером 1400 п.н., вырезанная из плазмиды pUC4K по аналогичному сайту-рестрикции.

Была получена итоговая, включающая в себя кассету Km-устойчивости, размером 1400 п.н., которая будет нарушать процесс считывание гена, и фрагмент самого гена, размером 767 п.н. Часть агарозного геля, содержащего созданную конструкцию, была вырезана препаративным методом, очищена геля специальным набором в колонках и применена в следующем этапе.

Заключительным этапом подготовки к трех родительскому скрещиванию стало переклонирование полученной генетической конструкции в вектор pEX18Tc. Выбор данного вектора обусловлен его способностью работать с грамотрицательными бактериями (участвовать в их трансформации), к которым принадлежит исследуемый штамм *A. baldaniorum* Sp245. Кроме того, данный вектор содержит маркер тетрациклин устойчивости, который будет использован при селекции полученных трансконъюгантов.

Затем были подготовлены компетентные клетки дикого штамма *A. baldaniorum* Sp245, а также штаммов *E. coli* DH5 α и K802. Трансформацию проводили кальциевым методом, после чего осуществили трёхродительское скрещивание на твердой среде (МСС). Полученные мутантные клетки были смыты с чашки Петри жидкой средой МСС, разведены до концентрации 10^{-4} и высеяны на селективные питательные среды, содержащие канамицин и тетрациклин. Целевые мутанты должны обладать устойчивостью только к канамицину, но быть чувствительными к тетрациклину. По результатам селекции были выбраны два подходящих клона — Sp245-*fliD*::Km-1 и Sp245-*fliD*::Km-2.

Результаты исследования подвижности бактерий в жидкой и полужидкой средах показали, что мутантные штаммы не проявляют подвижность в обоих этих средах. Также диаметр колец колоний мутантов в полужидкой среде в 5 раз меньше по сравнению с диким штаммом.

После анализа влияния гена *fliD* на подвижность штамма *A. baldaniorum* Sp245 следующим этапом стало морфологическое исследование жгутикового аппарата. Поскольку снижение или утрата подвижности может быть обусловлена нарушениями в структуре жгутика, особенно при мутациях в ключевых генах его сборки, таких как *fliD*, целесообразно провести фенотипическую оценку с использованием просвечивающей электронной микроскопии. В результате опыта было установлено, что у мутантного штамма не происходило синтеза как полярного, так и латеральных жгутиков.

С целью определения роли гена *fliD* в процессе биопленкообразования была проведена количественная оценка формирования биоплёнок в жидкой питательной среде с использованием кристаллического фиолетового. Анализ полученных результатов показал, что способность к формированию биопленок у мутантного штамма значительно снижена по сравнению с диким штаммом. Кроме того, было установлено, что наименьшее количество биопленок было образовано на средах без дополнительного источника азота.

Заключение

Жгутик играет ключевую роль в обеспечении подвижности бактерий и в процессе формирования биопленки. Ген *fliD* – один из важных генов, участвующих в его сборке. Несмотря на то, что функция этого гена в формировании жгутика известна, его влияние на подвижность и способность образовывать биопленки у грамотрицательных симбиотических бактерий остается малоизученным. Одной из таких бактерий является *A. baldaniorum* Sp245 – ризобактерия из группы PGPR, которая колонизирует корни злаковых растений, в том числе пшеницы – одну из ведущих сельскохозяйственных культур России. В связи с этим, изучение генов, в том числе *fliD*, участвующих в колонизации корней пшеницы представляет собой не только теоретический, но и практический интерес для агробиотехнологии.

В ходе работы было изучено влияние гена *fliD* на подвижность и способность к формированию биопленки бактерией *A. baldaniorum* Sp245.

В результате работы был создан штамм со вставкой кассеты устойчивости к канамицину в центральной части гена *fliD* с помощью сайт-направленного мутагенеза, вследствие чего считывание данного гена было нарушено, и экспрессия белка не происходила.

Анализ влияния гена *fliD* на подвижность показал, что мутантные штаммы утратили способность к движению как в жидкой, так и в полужидкой среде, а размер образованных колоний на полужидком агаре соответствует размеру укола.

При микроскопическом исследовании структуры жгутика было обнаружено, что у мутантных штаммов отсутствуют полярный и латеральные жгутики.

Результаты изучения влияния гена *fliD* на способность к биопленкообразованию показали, что у мутантных штаммов данная способность значительно снижена, что особо заметно на средах без

дополнительного источника азота. Также количество планктонных бактерий мутантного штамма оказалось снижено.

Полученные в результате комплексного исследования данные можно использовать для подтверждения роли изучаемого гена в процессах подвижности и пленкообразования у грамотрицательных бактерий на примере *A. baldaniorum* Sp245.

Выводы

1. Создана генетическая конструкция, содержащая кассету Km-устойчивости, которая была успешно введена в штамм *A. baldaniorum* Sp245.

2. В результате оценки подвижности мутантного и дикого штаммом в жидкой и полужидкой средах было установлено, что мутантные штаммы утратили способность к подвижности: диаметр сформированных колоний не превышал 4,9 мм, что в 5 раз меньше, чем у дикого штамма.

3. При фенотипическом сравнении структуры жгутикового аппарата было выявлено, что у мутантного штамма отсутствуют как полярный, так и латеральные жгутики.

4. Анализ способности к образованию биопленок на абиотических поверхностях в жидкой среде показал, что у мутантного штамма данный показатель снижен по сравнению с диким штаммом: на среде LB в 1,5 раза, на МСС с NH_4Cl – в 1,1 раза, на МСС без NH_4Cl – в 2 раза. Содержание планктонных клеток, окружающих биопленку, также снижена: на среде LB в 2,25 раза, на МСС с NH_4Cl – в 2,1 раза, на МСС без NH_4Cl – в 2,5 раза.

Список использованных источников

1 Wheatley, R. M., Poole, P. S. Mechanisms of bacterial attachment to roots / R. M. Wheatley, P. S. Poole // FEMS Microbiology Reviews. – 2018. – Vol. 42, Iss. 4. – P. 448–461.

- 2 Aldridge, P., Kelly, T. H. Regulation of flagellar assembly / P. Aldridge, T. H. Kelly // Current Opinion in Microbiology. – 2002. – Vol. 5, Iss. 2. – P. 160–165.
- 3 Molecular Cloning and Characterization of the *Helicobacter pylori* *fliD* Gene, an Essential Factor in Flagellar Structure and Motility / J. S. Kim [et al.] // Journal of Bacteriology. – 1999. – Vol. 181, Iss. 22. – P. 6969.
- 4 Identification of Adhesins in Plant Beneficial Rhizobacteria *Bacillus velezensis* SQR9 and Their Effect on Root Colonization / R. Huang [et al.] // Molecular Plant-Microbe Interactions. – 2022. – Vol. 35, №. 1. – <https://doi.org/10.1094/MPMI-09-21-0234-R>.
- 5 Contribution of flagellar cap gene in virulence and pathogenicity of *Aeromonas veronii* / Z. Cheng [et al.] // Journal of fish diseases. – 2023. – Vol. 46. – P. 247–259.
- 6 Biofilms: an overview of their significance in plant and soil health / I. Ahmad [et al.] // Biofilms in Plant and Soil Health. – 2017. – Vol. 1. – P. 1–25.
- 7 Biofilm formation enables free-living nitrogen-fixing rhizobacteria to fix nitrogen under aerobic conditions / W. Di [et al.] // The ISME Journal. – 2017. – Vol. 11, Iss. 7. – P. 1602–1613.
- 8 Chromosomal *flhB1* gene of the alphaproteobacterium *Azospirillum brasilense* Sp245 is essential for correct assembly of both constitutive polar flagellum and inducible lateral flagella / Y. Filip'echeva [et al.] // Folia Microbiologica. – 2018. – Vol. 63. – P. 147–153.
- 9 Isolation and characterization of plant growth-promoting rhizobacteria from wheat rhizosphere and their effect on plant growth promotion / M. Afshan [et al.] // Frontiers in Microbiology. – 2015. – Vol. 6. – doi: 10.3389/fmicb.2015.00198.
- 10 Döbereiner, J., Day, J. M. Associative symbiosis in tropical grass: characterization of microorganisms and dinitrogen fixing sites / J. Döbereiner, J. M. Day // Symposium on Nitrogen Fixation. – 1976. – P. 518–538.

11 Sambrook, J. Molecular cloning: a laboratory manual / J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis. – New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. – 1659 p.

