

Министерство образования и науки Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ Н.Г.ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра генетики

**ВЛИЯНИЕ МУТАЦИЙ НА ФОРМИРОВАНИЕ БИОПЛЁНОК
БАКТЕРИЯМИ *AZOSPIRILLUM BRASILENSE***

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

студента 2 курса 241 группы

Направления подготовки 06.04.01 Биология

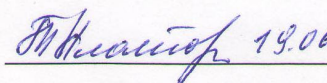
Биологического факультета

Синякина Дмитрия Николаевича

Научный руководитель:

доцент кафедры генетики,

к.б.н.

 19.06.18 Т.А.Алаторцева

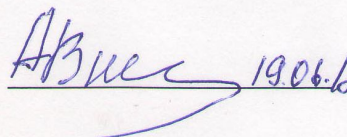
Научный консультант:

ведущий научный сотрудник

лаборатории генетики и

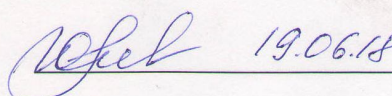
микроорганизмов

ИБФРМ РАН, д.б.н.

 19.06.18 А.В. Шелудько

Зав. кафедрой генетики,

д.б.н.

 19.06.18 О.И.Юдакова

Саратов 2018

Введение. Изучение изменения структуры О-специфических полисахаридов (ОПС) и физико-химических свойств липополисахаридов (ЛПС, Lps), синтезируемых бактериями, способных оказать влияние на формирование микроорганизмами биопленок *in planta* и эффективность функционирования ассоциативного симбиоза с растениями в условиях повышенного содержания ионов тяжелых металлов.

Цель работы – изучение особенности формирования биоплёнок у разных мутантных штаммов *A. brasilense*.

Для реализации цели исследования были поставлены и решались следующие задачи:

1. Оценить влияние различных концентраций CuSO_4 на рост бактериальных культур и способность клеток штамма *A. brasilense* Sp245 и его мутантов с изменениями в продукции поверхностных гликополимеров накапливать медь.

2. Исследовать воздействие меди на процесс колонизации корневой системы проростков пшеницы и формирования биопленок культурами штамма *A. brasilense* Sp245 и его мутантов с изменениями в структуре клеточной поверхности и подвижности.

3. Сравнить уровень продукции полисахаридов клетками родительского штамма и мутантов в процессе колонизации бактериями корневой системы проростков пшеницы и формирования биопленок.

4. Оценить влияние протеазы на процесс стабилизации биомассы биопленок азоспирилл.

Основное содержание. В главе «Основная часть» представлен анализ литературных данных об использовании азоспирилл в растительно-микробных взаимодействиях.

В главе «Результаты исследования» изложены экспериментально полученные данные по итогам проведенного эксперимента.

В качестве объектов исследования использовали пять мутантных штаммов *Azospirillum brasilense* и один дикий тип (таблица 1). Растительным

объектом, используемым в работе являлась пшеница *Triticum aestivum* сорта Саратовская 29.

Таблица 1 – Бактериальные штаммы *A. brasilense*, использованные в работе

Штамм	Характеристика
Sp245	Дикий тип, выделен в Бразилии из корней пшеницы
KM018	Cal ⁻ LpsII ⁻ -мутант Sp245 (p120::Omegon-Km), Km ^R
KM139	LpsII ⁻ -мутант Sp245 (p120::Omegon-Km), Km ^R
KM252	Cal ⁻ LpsI ⁻ -мутант Sp245 (p120::Omegon-Km), Km ^R
Sp245.1610	Km ^R Fla ⁻ Laf ⁻ (fabG1::Omegon-Km)
SK039	Fla ⁻ (mmsB1::Omegon-Km)

Для измерения оптической плотности использовался метод спеткрометрии, проводимый на модели спектрофотометра: ПромЭкоЛаб ПЭ-5400УФ.

При применении метода световой микроскопии использовали Фазово-контрастную микроскопию покровных стекол, перевернутых биопленкой вниз и помещенных на предметное стекло с лункой, проводили в Центре коллективного пользования научным оборудованием в области физико-химической биологии и нанобиотехнологии «Симбиоз» при ИБФРМ РАН (Саратов) на аппарате Leica LMD 7000 (Leica, Германия).

Проведение ИФА проводилось на иммуноферментном анализаторе АИФ-Ц-01С. В работе использованы штаммоспецифичные

антитела на ЛПС *A. brasilense* Sp245 (Ат 1), Ат на интактные клетки *A. brasilense*Cd (Ат 2), выявляющие поверхностные антигены белковой природы штамма Sp245, и штаммоспецифичные антитела на ЛПС *A. brasilense* Sp7 (Ат 3).

Результаты статистически обрабатывали с использованием пакета Microsoft Office Excel 2007. Доверительные интервалы определяли для 95% уровня значимости.

Важную роль в развитии растений играют ризобактерии, к которым относятся и азоспириллы. Они стимулируют рост и развитие растений, благодаря способности к фиксации атмосферного азота, продукции фитогормонов, контролю фитопатогенов. В природных экосистемах большинство бактерий существует в виде прикрепленных к субстратам биопленок, формирование которых является одним из способов их выживания. Изменения в структуре бактериальных плазмид могут привести к появлению мутантных штаммов бактерий с пониженной способностью формирования биопленок *in planta*. У таких бактерий происходит разрушение симбиотических связей, что ведёт к уменьшению ростовой активности и семенной продуктивности растений, что очень нежелательно особенно для сельскохозяйственных культур.

Получены данные о роли разнообразных компонентов клеточной поверхности белковой природы в формировании и стабилизации биопленок азоспирилл. Так, инактивация у бактерии *A. brasilense* Sp245 плазмидных генов, кодирующих гипотетические TAD пили, приводит к подавлению образования биопленок. Сохранение полярного жгутика (Fla) на клетках *A. brasilense* Sp245, интегрированных в зрелую биопленку, способствует поддержанию ее целостности и повышает ее устойчивость в условиях гидродинамического сдвига. Биопленки Fla⁻ мутантов содержат меньшее количество биомассы и менее стабильны по сравнению с биопленками родительского штамма Sp245. Однако биопленки мутантов, лишенных жгутиков, являются удобной моделью для изучения роли других структур

белковой природы, участвующих в организации матрикса биопленок. В данном аспекте интересны мутанты Sp245 по предполагаемым генам 3-гидроксиизобутиратдегидрогеназы (*mmsB1*) и 3-оксоацил-[ацил-переносящий белок]-редуктазы (*fabG1*). Эти мутанты имеют дефекты в образовании латеральных жгутиков (Laf) и/или Fla и соответственно в роении и активном плавании. Инактивация предполагаемых генов липидного обмена *fabG1* или *mmsB1* также повлияла на некоторые характеристики клеточной поверхности азоспирилл, включающие изменения в относительном содержании ряда жирных кислот в препаратах ЛПС, относительной гидрофобности и динамике агрегации планктонных клеток.

Биопленки Sp245, Sp245.1610 и SK039, сформированные на стекле под LB, после обработки трипсином в концентрации 100 мкг/мл, как и в случае проназы, сохраняли лишь $(78.6 \pm 7.4)\%$, $(71.0 \pm 13.3)\%$ и $(76.0 \pm 8.3)\%$ биомассы. По-видимому, снижение биомассы пленок является следствием разрушения протеазами, среди прочих, и поверхностных биополимеров, обуславливающих гемагглютинацию и участвующих в образовании межклеточных контактов.

Таким образом, использование в работе мутантов *A. brasilense*, лишенных жгутиков, позволило оценить роль биополимеров белковой природы, соединяющих и удерживающих бактерии в биопленке и обеспечивающих ее стабильность и прикрепление к поверхности. К таким биополимерам могут относиться структуры, обуславливающие гемагглютинирующую активность клеток, которая у мутантов в отличие от родительского штамма Sp245 выражена в меньшей степени.

В биопленках прикрепление азоспирилл (клетка/клетка/поверхность) независимо от их подвижности и способности синтезировать жгутики также обуславливают взаимодействия, чувствительные к изменению физико-химических параметров среды, окружающей пленки. Это наиболее заметно в случае биопленок, сформированных на гидрофобной поверхности под минимальной малатно-солевой средой. Необходимо отметить, что

иммунофлуоресцентная микроскопия с антителами на белковые антигены клеточной поверхности показывает наличие экспонированных белковых детерминант «планктонных клеток» у азоспирилл, сформировавших биопленки на корнях проростков пшеницы.

Сходные антигены присутствуют в биопленках этих бактерий, сформированных на модельной поверхности полистирола. Иммуноферментный анализ и параллельный подсчет колониеобразующих единиц позволили выявить возрастание относительного содержания белковых антигенов при адаптации азоспирилл к существованию на корнях растений. Таким образом, белковые структуры, стабилизирующие биопленки на абиотических поверхностях, могут выполнять сходную функцию и в случае биопленок азоспирилл, сформированных ими в корневой системе растения.

Выводы:

1. Избыток меди в среде инкубации способствует увеличению содержания полисахаридных антигенов в биопленках, сформированных *in planta* и/или на модельной поверхности полистирола штаммом *A. brasilense* Sp245 и его мутантами с измененным составом гликополимеров.

2. Штамм *A. brasilense* SP245, по сравнению с мутантами, в отношении формирования биоплёнок, является более устойчивым к воздействию ионов меди. Процесс колонизации корневой системы и формирование биоплёнок культурами штамма SP245, по сравнению с мутантными, в меньшей степени ингибируется ионами меди..

3. При адаптации к корням растений у клеток штамма Sp245 в присутствии 1.0 мМ меди заметно активизируется синтез полисахаридных детерминант. У CaI⁻ LpsI⁻ мутанта KM252 активация синтеза полисахаридов происходит не независимо от присутствия меди.

4. Изменения в продукции липополисахаридов у производных штамма *A. brasilense* Sp245 обуславливают снижение устойчивости к токсическому действию меди и увеличение ее накопления бактериальными клетками.

5. Отличные от жгутиков белковые компоненты поверхности азоспирилл, чувствительные к действию протеаз, необходимы для прочного соединения бактерий в биопленках на стекле и полистироле и прикрепления биопленок к полистиролу под богатой жидкой средой.