



Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2022. Т. 22, вып. 2. С. 215–225  
*Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology*, 2022, vol. 22, iss. 2, pp. 215–225  
<https://ichbe.sgu.ru>

<https://doi.org/10.18500/1816-9775-2022-22-2-215-225>

Научная статья  
УДК 579.222+579.262

## Изменение физико-химических и культуральных свойств бактерий *Azospirillum baldaniorum* Sp245 под влиянием некоторых синтетических кумаринов



М. В. Каневский<sup>1</sup>✉, В. О. Менухов<sup>2</sup>, И. С. Кошелева<sup>3</sup>, А. Ю. Кострицкий<sup>1</sup>, И. В. Каневская<sup>1</sup>, С. А. Коннова<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, Россия, 410012, г. Саратов, ул. Астраханская, д. 83

<sup>2</sup>Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук, Россия, 142290, г. Пущино Московской обл., ул. Институтская, д. 3

<sup>3</sup>Саратовский медицинский научный центр гигиены федерального бюджетного учреждения науки «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения» федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 410022, г. Саратов, ул. Заречная, здание 1А, строение 1

<sup>4</sup>Саратовский научный центр Российской академии наук (ИБФРМ РАН) Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук, Россия, 410049, г. Саратов, просп. Энтузиастов, д. 13

Каневский Матвей Владимирович, кандидат биологических наук, доцент кафедры биохимии и биофизики, [matvejkanev@mail.ru](mailto:matvejkanev@mail.ru), <https://orcid.org/0000-0002-5932-6748>

Менухов Владислав Олегович, магистрант, [vladmen1609.ru@mail.ru](mailto:vladmen1609.ru@mail.ru), <https://orcid.org/0000-0002-8432-0890>

Кошелева Ирина Сергеевна, младший научный сотрудник, [irishka-kosheleva@mail.ru](mailto:irishka-kosheleva@mail.ru), <https://orcid.org/0000-0003-1992-5305>

Кострицкий Александр Юрьевич, инженер кафедры органической и биоорганической химии Института химии, [alexandrkostritskiy@mail.ru](mailto:alexandrkostritskiy@mail.ru), <https://orcid.org/0000-0002-9154-3005>

Каневская Ирина Владимировна, кандидат химических наук, доцент кафедры органической и биоорганической химии Института химии, [irinatrashilina@mail.ru](mailto:irinatrashilina@mail.ru), <https://orcid.org/0000-0002-3981-8032>

Коннова Светлана Анатольевна, доктор биологических наук, <sup>1</sup>профессор, заведующий кафедрой биохимии и биофизики, <sup>4</sup>ведущий научный сотрудник ИБФРМ РАН, [konnovasa@yandex.ru](mailto:konnovasa@yandex.ru), <https://orcid.org/0000-0002-9607-8173>

**Аннотация.** Ввиду малого числа исследований роли кумаринов в ассоциативных симбиотических отношениях, впервые были изучены некоторые аспекты влияния синтетических кумаринов на физико-химические и культуральные свойства *Azospirillum baldaniorum* Sp245.

Для выявления роли гидроксирования в положении 7 конденсированного ароматического кольца – 1-(2-оксо-2Н-хромен-3-ил)бутан-1,3-диона проведены сравнительные исследования влияния исходного и гидроксированного кумаринов на культуру модельного штамма азоспирилл. Исследовали выживаемость бактерий при добавлении кумаринов методом подсчета КОЕ на агаризованной среде. Оценивали активность формирования биопленок культурой с использованием кристаллического фиолетового. Изучали изменение поверхности бактерий под действием кумаринов по электрической поляризуемости бактериальных клеток на электрооптическом анализаторе ELUS (“EloSystemGbr”, Germany). Исследовали выход и моносахаридный состав внеклеточных гликополимеров с использованием газожидкостной хроматографии. Впервые установлено, что гидроксированный препарат обладает более высокой антибактериальной активностью по сравнению с незамещённым. Выявлено снижение числа жизнеспособных клеток в планктонной культуре и торможение роста биопленок. Методом электрооптического анализа показано, что присутствие кумаринов в среде культивирования во всех исследуемых концентрациях приводит к изменению электрической поляризуемости клеток *A. baldaniorum* Sp245. Применение метода электрооптического анализа клеточных суспензий с использованием моноспецифических антител, полученных на липополисахарид данного штамма, позволило выявить отсутствие изменений в углеводных антигенных детерминантах на поверхности бактериальных клеток. Это согласуется с данными анализа состава экстраклеточных полисахаридов методом ГЖХ, в ходе которого не было выявлено отличий качественного состава и соотношения моносахаридов. Показано увеличение выхода ЭПС бактерий при росте в присутствии 1-(7-гидрокси-2-оксо-2Н-хромен-3-ил)бутан-1,3-диона в 1,2 и 1,7 раз для концентраций 50 и 100 мкМ. Полученные результаты позволяют рассматривать произошедшие изменения как особенности адаптации бактерий к ассоциативным условиям существования.

**Ключевые слова:** *Azospirillum baldaniorum*, кумарины, экстраклеточные полисахариды, электрооптический анализ, биопленки

**Для цитирования:** Каневский М. В., Менухов В. О., Кошелева И. С., Кострицкий А. Ю., Каневская И. В., Коннова С. А. Изменение физико-химических и культуральных свойств бактерий *Azospirillum baldaniorum* Sp245 под влиянием некоторых синтетических кумаринов // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2022. Т. 22, вып. 2. С. 215–225. <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2022-22-2-215-225>

Статья опубликована на условиях лицензии Creative Commons Attribution 4.0 International (CC-BY 4.0)



Article

**Changes in the physicochemical and cultural properties of the bacteria *Azospirillum baldaniorum* Sp245 under the influence of some synthetic coumarins**

M. V. Kanevsky<sup>1</sup>✉, V. O. Menukhov<sup>2</sup>, I. S. Kosheleva<sup>3</sup>, A. Yu. Kostritsky<sup>1</sup>, I. V. Kanevskaya<sup>1</sup>, S. A. Konnova<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Saratov State University, 83 Astrakhanskaya St., Saratov 410012, Russia

<sup>2</sup>Federal State Budgetary Institution of Science, Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of the Russian Academy of Sciences, 3 Institutskaya St., Pushchino 142290, Moscow Region, Russia

<sup>3</sup>Saratov Medical Research Center for Hygiene of the "Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies" of the Federal Service for Surveillance in the Field of Consumer Rights Protection and Human Welfare, 1A Zarechnaya St., Saratov 410022, Russia

<sup>4</sup>Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, 13 Entuziastov Ave., Saratov 410049, Russia

Matvey V. Kanevsky, matvejkanev@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5932-6748>

Vladislav O. Menukhov, vladmen1609.ru@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8432-0890>

Irina S. Kosheleva, irishka-kosheleva@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-1992-5305>

Alexander Yu. Kostritsky, alexandrkostritskiy@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9154-3005>

Irina V. Kanevskaya, irinastrashilina@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3981-8032>

Svetlana A. Konnova, konnovasa@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9607-8173>

**Abstract.** Due to the small number of studies on the role of coumarins in associative symbiotic relationships, some aspects of the influence of synthetic coumarins on the physicochemical and cultural properties of *Azospirillum baldaniorum* Sp245 were studied for the first time. To reveal the role of hydroxylation in position 7 of the fused aromatic ring – 1-(2-oxo-2H-chromen-3-yl)butan-1,3-dione, comparative studies of the effect of the original and hydroxylated coumarins on the culture of a model strain of azospirilla were carried out. The survival of bacteria after the addition of coumarins was studied by counting CFU on an agar medium. The biofilm formation activity of the culture was assessed using crystal violet. The change in the surface of bacteria under the action of coumarins was studied by the electrical polarizability of bacterial cells on an ELUS electrooptical analyzer (EloSystemGbR, Germany). The yield and monosaccharide composition of extracellular glycopolymers were studied using gas-liquid chromatography. For the first time, an increase in the yield of EPS of bacteria during growth in the presence of 1-(7-hydroxy-2-oxo-2H-chromen-3-yl)butan-1,3-dione by 1.2 and 1.7 times for concentrations of 50 and 100 µM respectively was observed. It has been established for the first time that the hydroxylated substance has a higher antibacterial activity compared to the unsubstituted one. A decrease in the number of viable cells in planktonic culture and inhibition of biofilm growth were revealed. It has been shown by electro-optical analysis that the presence of coumarins in the cultivation medium in all concentrations studied leads to a change in the electrical polarizability of *A. baldaniorum* Sp245 cells. The use of electrooptical analysis of cell suspensions using monospecific antibodies obtained against lipopolysaccharides of this strain made it possible to reveal the absence of changes in carbohydrate antigenic determinants on the surface of bacterial cells. This is consistent with the data of the analysis of the composition of extracellular polysaccharides by GLC, during which no differences were found in the qualitative composition and ratio of monosaccharides. An increase in the yield of bacterial EPS during growth in the presence of 1-(7-hydroxy-2-oxo-2H-chromen-3-yl)butan-1,3-dione by 1.2 and 1.7 times for concentrations of 50 and 100 µM was shown. The results obtained allow us to consider the changes that have occurred as features of the adaptation of bacteria to the associative conditions of existence.

**Keywords:** *Azospirillum baldaniorum*, coumarins, extracellular polysaccharides, electrooptical analysis, biofilms

**For citation:** Kanevsky M. V., Menukhov V. O., Kosheleva I. S., Kostritsky A. Yu., Kanevskaya I. V., Konnova S. A. Changes in the physicochemical and cultural properties of the bacteria *Azospirillum baldaniorum* Sp245 under the influence of some synthetic coumarins. *Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology*, 2022, vol. 22, iss. 2, pp. 215–225 (in Russian). <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2022-22-2-215-225>  
This is an open access article distributed under the terms of Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC-BY 4.0)

## Введение

Сложный комплекс взаимодействий между растениями и ризосферными и почвенными микроорганизмами опосредуется множеством продуцируемых ими химических сигналов, в том числе вторичных метаболитов. Корневые экссудаты растений содержат в себе широкий спектр соединений, каждое из которых выполняет определённую функцию [1, 2]. Среди вторичных метаболитов растений, выделяемых в окружающую среду, вещества фенольной природы (флавоноиды, антоцианы, феноловые кислоты, кумарины и др.) занимают особое место в связи с их разноплановым влиянием на организмы в ризосфере. Более 1300 кумаринов были иденти-

фицированы как вторичные метаболиты растений. Известно, что эти соединения присутствуют в растениях, относящихся к 30 различным семействам, в том числе Rosaceae, Caprifoliaceae, Oleaceae, Apiaceae, Asteraceae, Papilionaceae, Rosaceae и др. [1–4]. При этом роль кумаринов в растительно-бактериальных взаимодействиях до конца не выяснена, несмотря на широкий спектр исследований их биологической активности [3, 4]. Связано это в том числе с многообразием и сложностью как фенольных метаболитов, так и реализуемых ими стратегий воздействия на растительно-микробные сообщества в условиях формирования симбиотических отношений. Более исследован вопрос, связанный с кумари-



нами бобовых растений, благодаря упрощению системы за счет использования модельных экспериментов с участием растений арабидопсиса и некоторых ризобактерий из группы PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) [5, 6].

В последние годы выявлено, что фенилпропаноиды кумаринового ряда могут действовать как фитоалексины, они накапливаются на поверхности листьев, плодов и семян, подавляют рост и спорообразование грибковых патогенов растений. Также многие растительные кумарины обладают антимикробной активностью [7–9], которая может проявляться в угнетении роста и формирования биоплёнок. Однако для кумаринов, в отличие от флавоноидов, механизм торможения роста биоплёнок до сих пор остаётся неизученным [10, 11].

Установлено, что антибактериальная активность кумаринов зависит от количества и полярности кислородсодержащих заместителей в бензольном кольце [12], поэтому нами были выбраны однократно замещённый гидроксильной группой и для сравнения незамещённый в бензольном кольце представители [13, 14], относящиеся к группе простых кумаринов [3]. К этой группе также относятся такие хорошо изученные кумарины, как умбеллиферон и скополетин [9, 15, 16].

Поскольку особый интерес представляет выяснение характера воздействия кумаринов на ассоциативные микроорганизмы, влияние их на реализацию начальных стадий формирования ассоциативного симбиоза, цель данной работы состояла в выявлении влияния соединений – представителей класса кумаринов на физико-химические и культуральные свойства ассоциативных азотфиксирующих бактерий *Azospirillum baldaniorum* Sp245.

### Материалы и методы

В работе использован штамм *A. baldaniorum* Sp245 [17, 18], любезно предоставленный коллекцией микроорганизмов Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов, ФИЦ «Саратовский научный центр РАН» (ИБФРМ РАН) (г. Саратов).

Культуру бактерий выращивали в жидкой синтетической малатно-солевой среде [19] без добавления солей железа при постоянном перемешивании на вибростенде в течение 24 часов и температуре 30°C.

В работе использовали 2 синтетических кумарина: 1-(2-оксо-2Н-хромен-3-ил)бутан-1,3-дион (кумарин 1) и 1-(7-гидрокси-2-оксо-2Н-хромен-3-ил)бутан-1,3-дион (кумарин 2), которые были любезно предоставлены сотрудниками

кафедры органической и биоорганической химии Института химии Саратовского национального исследовательского государственного университета имени Н. Г. Чернышевского. Кумарины были синтезированы в соответствии с известными методиками [13, 14].

Исследуемые вещества добавляли в виде раствора в диметилсульфоксиде (ДМСО) в среду после стерилизации перед внесением инокулята до исследуемой концентрации. В контрольный образец добавляли только ДМСО, содержание которого в среде составляло 1% (об/об). Инокулят вносили в среду до оптической плотности  $OD_{600nm} = 0,09–0,11$ , что соответствовало показателю КОЕ  $2,1 \times 10^4$ . Измерение  $OD$  суспензии выполняли на Specord 40 (Analytik Jena, Германия).

Для подсчета количества колониеобразующих единиц (КОЕ), формирующихся из отдельных жизнеспособных клеток после выращивания в присутствии кумаринов, использовали стандартный метод посева на поверхность плотной питательной среды, как описано [20].

Подготовку образцов и измерение электрической поляризуемости выполняли на электрооптическом (ЭО) анализаторе ELUS (“EloSystemGbR”, Germany). Параметры измерения: напряженность электрического поля 89,4 В/см, длина волны света 670 нм (относительно вакуума), время приложения электрического поля 4,5 с [21, 22].

Моноспецифические антитела были получены на обработанные глутаровым альдегидом клетки *A. baldaniorum* Sp245 по известной методике [23]. Антитела добавляли к суспензии клеток до итоговой концентрации 6 мкг/мл, 5 мин инкубировали при комнатной температуре, после чего проводили анализ электрической поляризуемости суспензии.

Производство экстраклеточных полисахаридов азоспирилл проводили, оценивая отношение количества полисахаридов в культуральной жидкости бактерий, определённое по методу Дюбуа [24], к массе высушенных до постоянного веса клеток.

Выделение экстраклеточных полисахаридов (ЭПС) проводили путём добавления 3 объемов охлажденного этанола к холодной бесклеточной культуральной жидкости и выдерживания в течение 24 ч при 4°C с последующим центрифугированием, диализом и лиофилизацией [25].

Моносахаридный состав ЭПС исследовали методом ГЖХ ацетатов полиолов на хроматографе Shimadzu GC-2014. Образцы предварительно гидролизуют 2М  $CF_3COOH$  (120°C, 2 ч) с последующим восстановлением  $NaBH_4$  и ацетилированием [26].



Определение активности роста биоплёнок проводили в 96-луночных плоскодонных микропланшетах после 6 суток культивирования с использованием кристаллического фиолетового красителя по методике [27].

Для каждой серии экспериментов проводили не менее пяти повторов опытов. Анализ и представление данных осуществляли при помощи программы Microsoft Excel 2010 и стандартных методов статистической обработки.

### Результаты и их обсуждение

Для исследования активности кумаринов в отношении бактерий – ассоциативных азотфик-

саторов – были взяты 2 синтетических кумарина: кумарин 1 и далее кумарин 2 (см. выше). Кумарины для экспериментов были подобраны исходя из вопроса корреляции структуры этих веществ и их биологических свойств. Отличие между ними заключается в присутствии гидроксильной группы в конденсированном ароматическом кольце (положение 7) (рис. 1). Поскольку известно, что наличие в структуре органических веществ гидроксильных групп обуславливает значительное увеличение биологической активности [12], исследуемые вещества представляют значительный научный интерес как удобная модель оценки влияния заместителя на активность кумаринов.

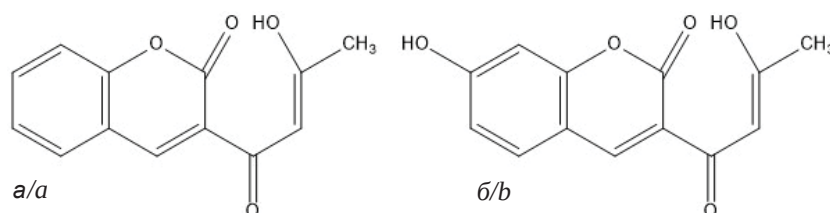


Рис. 1. Структурные формулы исследуемых кумаринов: а – 1-(2-оксо-2H-хромен-3-ил)бутан-1,3-дион, б – 1-(7-гидрокси-2-оксо-2H-хромен-3-ил)бутан-1,3-дион  
Fig. 1. Structural formulas of the studied coumarins: a – 1-(2-oxo-2H-chromen-3-yl)butane-1,3-dione, b – 1-(7-hydroxy-2-oxo-2H-chromen-3-yl)butane-1,3-dione

Поскольку для фенольных соединений известна зависящая от концентрации метаболита антибактериальная активность [1, 3, 4], на первом этапе было рассмотрено влияние выбранных кумаринов на рост бактерий. Результаты исследования показали, что КОЕ бактерий, выращенных на среде с кумарином 1 при всех исследуемых концентрациях, достоверно не отличались от

контрольных значений ( $2,4 \times 10^8$ ) (рис. 2), что согласуется с литературными данными об антибактериальной активности незамещённых кумаринов [2, 6].

Действие кумарина 2 проявлялось в достоверном зависимом от концентрации препарата существенном подавлении роста культуры, о чём свидетельствовало понижение числа КОЕ.

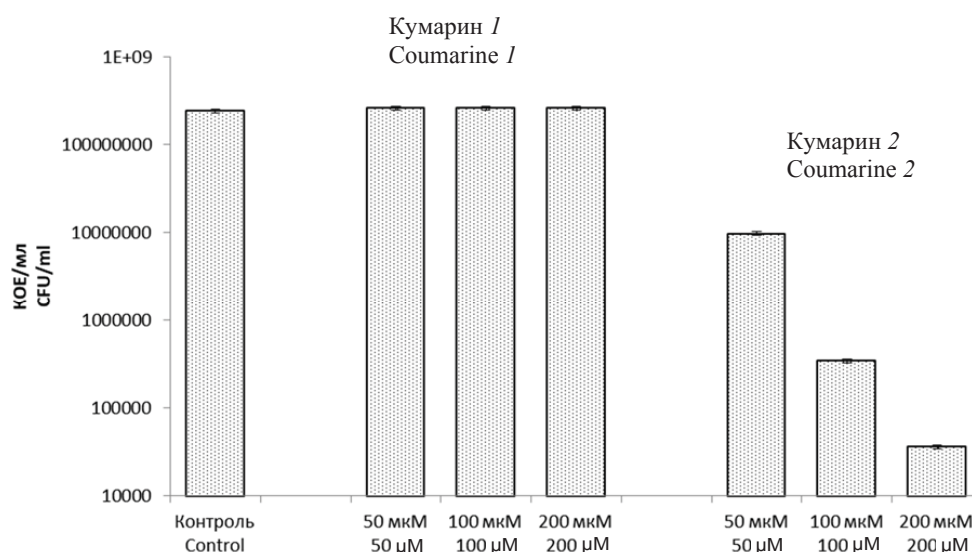


Рис. 2. Показатели КОЕ *A. baldaniorum* Sp245, выращенных в присутствии кумаринов  
Fig. 2. CFU of *A. baldaniorum* Sp245 grown in the presence of coumarins



Полученные результаты хорошо согласуются с литературными данными, касающимися активности гидроксированных кумаринов [12, 28]. Для концентраций 50, 100 и 200 мкМ было зарегистрировано число КОЕ, равное  $9,8 \times 10^6$ ,  $3,4 \times 10^6$ ,  $3,6 \times 10^4$  соответственно. Нарастания биомассы азоспирилл в присутствии кумарина 2 в концентрации 200 мкМ не наблюдалось, о чем свидетельствовали незначительные изменения оптической плотности культуры за 24 ч, при сохранении жизнеспособности с числом КОЕ, соответствующим таковому до начала роста. Это позволяет констатировать бактериостатический эффект кумарина 2, в отличие от кумарина 1. Таким образом, 200 мкМ кумарина 2 – это минимальная концентрация, ингибирующая рост *A. baldaniorum* Sp245.

Важной характеристикой колонизационного потенциала ассоциативных бактерий по отношению к растениям является их способность

формировать биопленки на различных поверхностях. Изменения в активности образования бактериями биоплёнок, как правило, отражают изменения спектра свойств компонентов их поверхности [29, 30]. Добавление в среду выращивания обоих кумаринов приводило к снижению активности роста биоплёнок азоспирилл. Наименьший рост биоплёнок наблюдался при действии кумарина 2 в концентрации 200 мкМ, снижение показателя составило 55% (рис. 3). Для кумарина 1 во всех рассмотренных концентрациях данный параметр не превышал 20%. Полученные результаты подтверждают бактериостатический эффект кумарина 2. Полученные данные позволяют сделать предположение, что экскреция кумаринов может использоваться растением для контроля численности микроорганизмов, в том числе и патогенных, что согласуется с данными литературы [6, 10, 11].

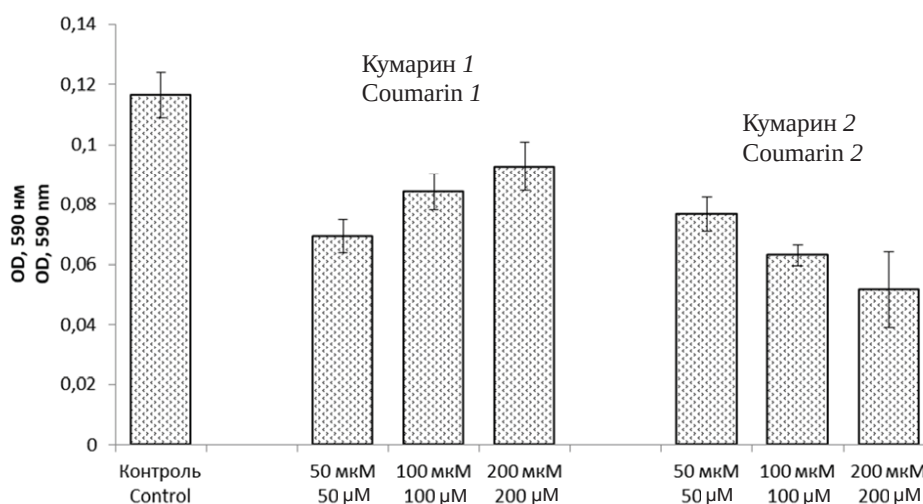


Рис. 3. Сравнение роста биоплёнок *A. baldaniorum* Sp245, выращенных в присутствии кумаринов

Fig. 3. Comparison of the *A. baldaniorum* Sp245 biofilms growth in the presence of coumarins

Удобным и быстрым методом оценки влияния различных веществ на бактерии служит метод электрооптического анализа. Наложение ориентирующего электрического поля приводит к приобретению клеткой индуцированного дипольного момента, который влияет на расположение клеток в пространстве. Это отражается на величине ЭО-сигнала. Любые изменения ЭО-спектров могут свидетельствовать о происходящих с бактериальными клетками изменениях [21, 22].

Было установлено, что введение в культуральную среду бактерий исследуемых веществ приводило к изменениям в ЭО-спектрах опытных клеток по сравнению с контрольными. Так,

показано, что кумарин 1 обуславливает только снижение ЭО-сигнала суспензий клеток, выращенных в его присутствии, во всём диапазоне частот (рис. 4, а).

Действие кумарина 2 в концентрации 200 мкМ проявлялось в увеличении показателя ЭО-сигнала, в то время как более низкие концентрации давали только снижение данного параметра (см. рис. 4, б). Кумарин 1 в самой высокой концентрации (200 мкМ) приводил к уменьшению ЭО-сигнала в области высоких частот на 20%, а в концентрации 50 и 100 мкМ снижение сигнала на 15 и 30% соответственно наблюдалось в диапазоне низких частот.

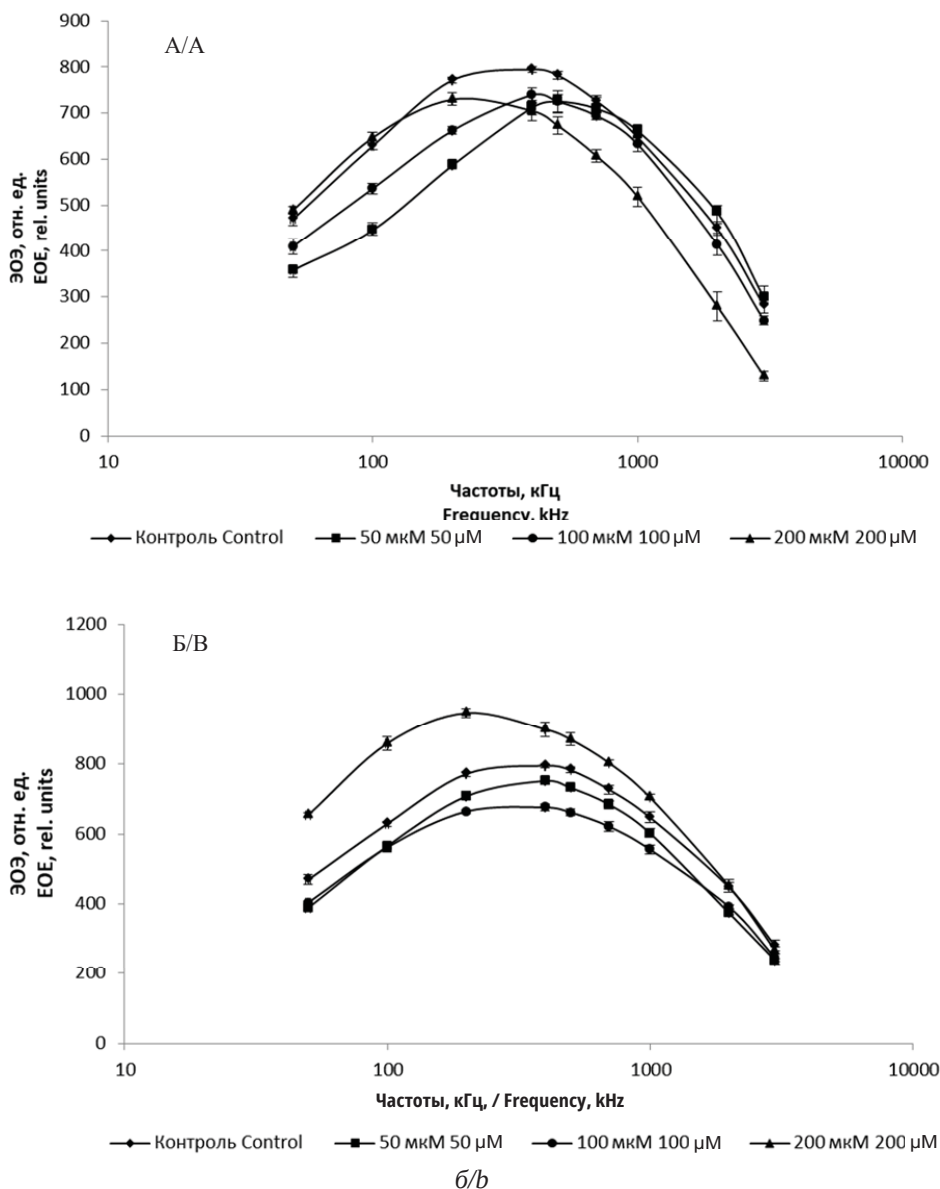


Рис. 4. ЭО-спектры клеток *A. baldaniorum* Sp245, выращенных в присутствии различных концентраций кумарина 1 (а) и кумарина 2 (б)  
Fig. 4. EO spectra of *A. baldaniorum* Sp245 cells grown in the presence of various concentrations of coumarin 1 (a) and coumarin 2 (b)

Изменения в диапазонах средних (400–700 кГц) и высоких (1000–3000 кГц) частот свидетельствуют об изменениях в составе мембран и цитоплазмы [21].

Выявленные отличия ЭО-спектров опытных образцов в низкочастотной области свидетельствуют об изменении в молекулах, представленных на поверхности бактериальных клеток [21]. Мажорным компонентом внешней мембраны азоспирилл, как грамотрицательных бактерий, является липополисахарид (ЛПС) [31], структура которого может претерпевать изменения под влиянием фенольных соединений [32, 33], поэтому

было проведено исследование взаимодействия бактериальных клеток с моноспецифическими антителами к ЛПС данного штамма методом ЭО-анализа. Такое тестирование направлено на выявление изменений в структуре антигенных детерминант в составе ЛПС.

Судя по результатам, представленным на рис. 5, было выявлено сохранение характера изменения ЭО-сигнала в реакции антител на бактериальные клетки, выращенные в присутствии кумаринов, и интактные клетки.

Немаловажным показателем специфичности является количественная характеристика взаи-

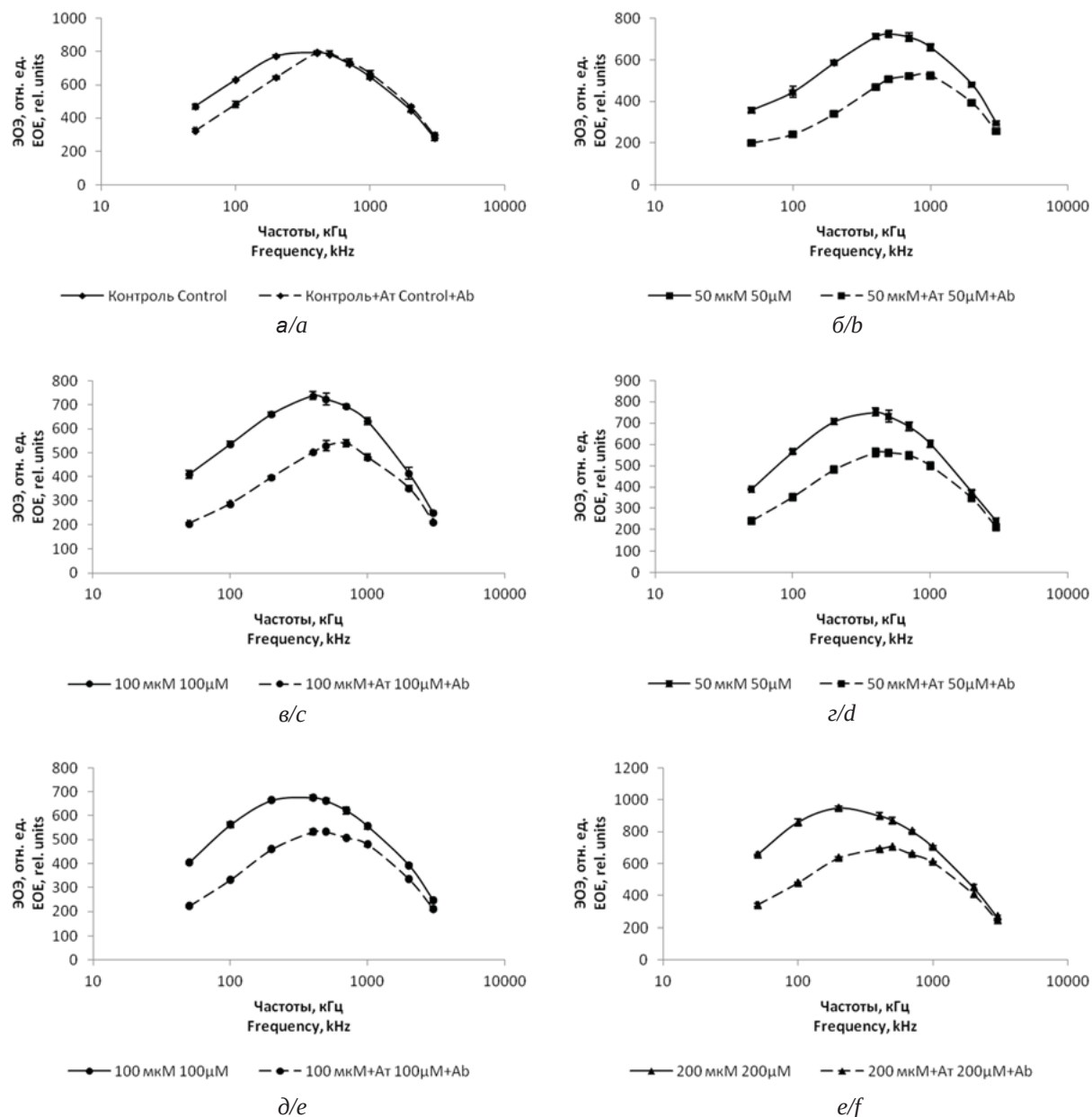


Рис. 5. ЭО-спектры клеток *A. baldaniorum* Sp245 при взаимодействии с  $Ab_{Sp245}$ : а – контроль; б, в – кумарин 1, г–е – кумарин 2

Fig. 5. EO spectra of *A. baldaniorum* Sp245 cells during interaction with  $Ab_{Sp245}$ : a – control; b, c – coumarin 1, d–f – coumarin 2

модействия. Если две суспензии клеток не отличаются по количеству клеток и содержанию антител, то ЭО-сигнал будет неизменен при одинаковом уровне взаимодействия [22]. Отличия между ЭО-сигналами суспензии клеток без добавления антител и содержащей антитела составляли 30% для контроля и 30–45% для опытных вариантов. Снижения показателя, которое характеризовало бы уменьшение сродства, не наблюдалось, что свидетельствует о сохранении уровня взаимодействия антител с клетками. Этот факт указывает на то, что структуры углеводных антигенных детерминант остались неизменными.

Однако, учитывая широкий спектр гликополимеров, присутствующий на поверхности азоспирилл, и имеющиеся в литературе данные об изменении продукции и состава ЭПС под действием экстрактов корней пшеницы и отдельных фенольных соединений [32, 33], были выполнены анализы гликанов поверхности бактерий химическими методами.

Для выявления влияния исследуемых кумаринов на продукцию внеклеточных гликополимеров были проведены процедуры преципитации гликанов спиртом из культуральной среды бактерий с последующим исследованием выхода их на



единицу веса бактериальных клеток. Установлено, что присутствие кумарина 1 в среде, вне зависимости от концентрации, не приводило к достоверному изменению выхода экзополисахаридов. Действие кумарина 2 проявлялось в увеличении продукции ЭПС в 1,2 и 1,7 раз для

концентраций 50 и 100 мкМ соответственно. Исследования состава и соотношения моносахаридов в гликополимерах, проведенные методом ГЖХ, выявили, что изменения состава ЭПС *A. baldaniorum* Sp245 как результата действия кумаринов не происходило (таблица).

**Состав и соотношение моносахаридов ЭПС *A. baldaniorum* Sp245, выращенных в присутствии кумаринов**  
**Composition and ratio of monosaccharides of *A. baldaniorum* Sp245 EPS, grown in the presence of coumarins**

Исследуемые образцы / Samples under study	Содержание в % от суммы пиков ацетатов полиолов / Content in % of the sum of peaks of polyol acetates	
	Rha	Glc
Контроль / Control	84±5	16±3
Кумарин 1, 50 мкМ / Coumarin 1, 50 μM /	87±4	13±2
Кумарин 2, 50 мкМ / Coumarin 2, 50 μM	91±6	9±3

Эти данные коррелируют с результатами, полученными при анализе взаимодействия моноспецифических антител с клетками в ходе ЭО-анализа.

#### Заключение

Выявлено, что из двух исследуемых кумаринов активность в отношении *A. baldaniorum* Sp245 проявляет только замещённый в бензольном кольце 1-(7-гидрокси-2-оксо-2Н-хромен-3-ил)бутан-1,3-дион. Для данного фенилпропаноида установлено, что из исследуемых концентраций 200 мкМ является минимальной ингибирующей рост бактерий. Также при наличии обоих кумаринов в среде культивирования наблюдается торможение роста биоплёнок.

Присутствие кумаринов в среде культивирования приводит к достоверному изменению ЭО-спектров всех опытных образцов по сравнению с контрольным. Однако уровень взаимодействия клеток с моноспецифичными антителами не снижался по сравнению с контрольными значениями, что свидетельствовало о сохранении структуры антигенных детерминант ЛПС. Отсутствие качественных изменений было выявлено методом ГЖХ при анализе ЭПС бактериальных культур. Однако в присутствии 1-(7-гидрокси-2-оксо-2Н-хромен-3-ил)бутан-1,3-диона выход ЭПС возрастал до 1,7 раз по сравнению с контролем. Полученные эффекты могут быть рассмотрены как особенности адаптации бактериальных клеток к существованию в условиях ассоциативных симбиотических отношений с растениями, продуцирующими разнообразные вторичные метаболиты фенольной природы.

Показана важная роль гидроксильной группы в положении 7 конденсированного ароматического кольца в активизации эффекта кумарина в отношении ассоциативных ризобактерий рода *Azospirillum*.

#### Список литературы

1. Venugopala K. N., Rashmi V., Odhav B. Review on natural coumarin lead compounds for their pharmacological activity // BioMed Research International. 2013. Vol. 2013, № 6. Art. № 963248.
2. Zhang J., Subramanian S., Stacey G., Yu O. Flavones and flavonols play distinct critical roles during nodulation of *Medicago truncatula* by *Sinorhizobium meliloti* // The Plant Journal. 2008. Vol. 5, № 1. P. 171–183.
3. Matos M. J., Santana L., Uriarte E., Abreu O. A., Molina E., Yordi E. G. Coumarins – an important class of phytochemicals // Comprehensive Natural Products Chemistry. 2015. Vol. 45, № 5. P. 113–140.
4. Wang X., Mao Z. G., Song B. B., Chen C. H., Xiao W. W., Hu B., Wang J.-W., Jiang X.-B., Zhu Y.-H., Wang H. J. Advances in the study of the structures and bioactivities of metabolites isolated from mangrove derived fungi in the South China Sea // Marine Drugs. 2013. Vol. 11, № 6. P. 601–3616.
5. Yu K., Stringlis I. A., Van Bentum S., De Jonge R., Snoek B. L., Pieterse C., Bakker P., Berendsen R. L. Transcriptome signatures in *Pseudomonas simiae* WCS417 shed light on role of root-secreted coumarins in Arabidopsis-mutualist communication // Microorganisms. 2021. Vol. 9, № 3. P. 575–590.
6. Rolfe S. A., Griffiths J., Ton J. Crying out for help with root exudates: Adaptive mechanisms by which stressed plants assemble health-promoting soil microbiomes // Current Opinion in Microbiology. 2019. Vol. 49. P. 73–82.





7. Stringlis I. A., Yu K., Feussner K., De Jonge R., Van Bentum S., Van Verk M. C., Berendsen R. L., Bakker P. A. H. M., Feussner I., Pieterse C. M. J. MYB72-dependent coumarin exudation shapes root microbiome assembly to promote plant health // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2018. Vol. 115. P. E5213–E5222.
8. Gnonlonfin G. J. B., Sanni A., Brimer L. Review. Scopoletin – A coumarin phytoalexin with medicinal properties // *Critical Review in Plant Sciences*. 2012. Vol. 31. P. 47–56.
9. Beyer S. F., Beesley A., Rohmann P. F., Schultheiss H., Conrath U., Langenbach C. J. The Arabidopsis non-host defence-associated coumarin scopoletin protects soybean from Asian soybean rust // *The Plant Journal*. 2019. Vol. 99. P. 397–413.
10. Reen F. J., Gutiérrez-Barranquero J. A., Parages M. L., O’Gara F. Coumarin : A novel player in microbial quorum sensing and biofilm formation inhibition // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2018. Vol. 102, № 5. P. 2063–2073.
11. Roy R., Tiwari M., Donelli G., Tiwari V. Strategies for combating bacterial biofilms : A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action // *Virulence*. 2018. Vol. 9, № 1. P. 522–554.
12. Kayser O., Kolodziej H. Antibacterial activity of simple coumarins : Tructural requirements for biological activity // *Zeitschrift für Naturforschung*. 1999. Vol. 54, № 3-4. P. 169–174.
13. Makhloufi-Chebli M., Hamdi M., Silva A. M. S., Balegroune F. Translactonisation intramoléculaire assistée par micro-ondes. Synthèse des coumarines // *Journal of the Algerian Chemical Society*. 2008. Vol. 18, № 1. P. 91–101.
14. De March P. Moreno-Manas M., Roca J. L. The reactions of 4-hydroxy-2-pyrones with 2-hydroxybenzaldehydes. A Note of Warning // *Journal of Heterocyclic Chemistry*. 1984. Vol. 21, № 5. P. 1371–1372.
15. Kostova I. Synthetic and natural coumarins as anti-oxidants // *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. 2006. Vol. 6, № 4. P. 365–374.
16. Lin Y., Sun X., Yuan Q., Yan Y. Combinatorial biosynthesis of plant-specific coumarins in bacteria // *Metabolic Engineering*. 2013. Vol. 18, № 12. P. 69–77.
17. Baldani V. L. D., Baldani J. I., Döbereiner J. Effect of *Azospirillum* inoculation on root infection and nitrogen incorporation in wheat // *Canadian Journal of Microbiology*. 1983. Vol. 29. P. 924–929.
18. Santos Ferreira N. dos, Hayashi Sant’Anna F., Massena Reis V., Ambrosini A., Gazolla Volpiano C., Rothballer M., Schwab S., Baura V. A., Balsanelli E., Oliveira Pedrosa F. de, Passaglia L. M. P., Souza E. M. de, Hartmann A., Cassan F., Zilli J. E. Genome-based reclassification of *Azospirillum brasilense* Sp245 as the type strain of *Azospirillum baldaniorum* sp. nov // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2020. Vol. 70, № 12. P. 6203–6212.
19. Konnova S. A., Skvortsov I. M., Makarov O. E., Ignatov V. V. Characteristics of polysaccharide complexes produced by *Azospirillum brasilense* and of the polysaccharides derived from them // *Microbiology*. 1994. Vol. 63. P. 1020–1030.
20. Методы общей бактериологии : в 3 т. / под ред. Ф. Герхардта. М. : Мир, 1983. Т. 1. 420 с.
21. Guliy O. I., Velichko N. S., Fedonenko Y. P., Bunin V. D. Use of an electro-optical sensor and phage antibodies for immunodetection of *Herbaspirillum* // *Talanta*. 2019. Vol. 202. P. 362–368.
22. Guliy O. I., Bunin V. D. Electro-optical analysis as sensing system for detection and diagnostics of bacterial cells // *Biointerface Engineering: Prospects in Medical Diagnostics and Drug Delivery*. Singapore : Springer, 2020. P. 233–254.
23. Gulii O. I., Matora L. Y., Burygin G. L., Dykman L. A., Ignatov V. V., Ignatov O. V. Electrooptical properties of the microbial suspensions during a cell’s interaction with the antibodies of a different specificity // *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2010. Vol. 46, № 1. P. 61–64.
24. Dubois M., Gilles K. A., Gamillor J. K., Rebers P. Q., Smitli F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances // *Analytical Chemistry* 1956. Vol. 28, № 3. P. 350–356.
25. Del Gallo M., Haegi A. Characterization and quantification of exocellular polysaccharides in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum* // *Symbiosis*. 1990. Vol. 9. P. 155–161.
26. Sawadecker J. S., Sloneker J. H., Jeanes A. Quantative determination of monosaccharides as their alditol acetates by gas liquid chromatography // *Analytical Chemistry*. 1965. Vol. 37. P. 1602–1603.
27. O’Toole G. A. Kolter R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways : A genetic analysis // *Molecular Microbiology*. 1998. Vol. 28, № 3. P. 449–461.
28. Smyth T., Ramachandran V. N., Smyth W. F. A study of the antimicrobial activity of selected naturally occurring and synthetic coumarins // *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2009. Vol. 33, № 5. P. 421–426.
29. Shelud’ko A. V., Filip’echeva Yu. A., Telesheva E. M., Burov A. M., Evstigneeva S. S., Burygin G. L., Petrova L. P. Characterization of carbohydrate-containing components of *Azospirillum brasilense* Sp245 biofilms // *Microbiology*. 2018. Vol. 87, № 5. P. 610–620.
30. Burdman S., Jurkevitch E., Soria-Díaz M. E., Serrano A. M. G., Okon Y. Extracellular polysaccharide composition of *Azospirillum brasilense* and its relation with cell aggregation // *FEMS Microbiology Letters*. 2000. Vol. 189, № 2. P. 259–264.
31. Fraysse N., Couderc F., Poinsot V. Surface polysaccharides involvement in establishing the rhizobium-legume symbiosis // *European Journal of Biochemistry*. 2003. Vol. 270. P. 1365–1380.
32. Fischer S. E., Miguel M. J., Morri G. B. Effect of root exudates on the polysaccharide composition and the lipopolysaccharide profile of *Azospirillum brasilense* Cd under saline stress // *FEMS Microbiology Letters*. 2003. Vol. 219. P. 53–62.



33. Kanevskiy M. V., Konnova S. A., Boyko A. S., Fedonenko Y. P., Sigida E. N., Ignatov V. V. Effect of flavonoids on the composition of surface glycopolymers of *Azospirillum lipoferum* Sp59b // *Microbiology*. 2014. Vol. 83, № 1. P. 15–22.

## Reference

1. Venugopala K. N., Rashmi V., Odhav B. Review on natural coumarin lead compounds for their pharmacological activity. *BioMed Research International*, 2013, vol. 2013, no. 6, art. no. 963248.
2. Zhang J., Subramanian S., Stacey G., Yu O. Flavones and flavonols play distinct critical roles during nodulation of *Medicago truncatula* by *Sinorhizobium meliloti*. *The Plant Journal*, 2008, vol. 5, no. 1, pp. 171–183.
3. Matos M. J., Santana L., Uriarte E., Abreu O. A., Molina E., Yordi E. G. Coumarins – an important class of phytochemicals. *Comprehensive Natural Products Chemistry*, 2015, vol. 45, no. 5, pp. 113–140.
4. Wang X., Mao Z. G., Song B. B., Chen C. H., Xiao W. W., Hu B., Wang J.-W., Jiang X.-B., Zhu Y.-H., Wang H. J. Advances in the study of the structures and bioactivities of metabolites isolated from mangrove derived fungi in the South China Sea. *Marine Drugs*, 2013, vol. 11, no. 6, pp. 601–3616.
5. Yu K., Stringlis I. A., Van Bentum S., De Jonge R., Snoek B. L., Pieterse C., Bakker P., Berendsen R. L. Transcriptome signatures in *Pseudomonas simiae* WCS417 shed light on role of root-secreted coumarins in Arabidopsis-mutualist communication. *Microorganisms*, 2021, vol. 9, no. 3, pp. 575–590.
6. Rolfe S. A., Griffiths J., Ton J. Crying out for help with root exudates: Adaptive mechanisms by which stressed plants assemble health-promoting soil microbiomes. *Current Opinion in Microbiology*, 2019, vol. 49, pp. 73–82.
7. Stringlis I. A., Yu K., Feussner K., De Jonge R., Van Bentum S., Van Verk M. C., Berendsen R. L., Bakker P. A. H. M., Feussner I., Pieterse C. M. J. MYB72-dependent coumarin exudation shapes root microbiome assembly to promote plant health. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2018, vol. 115, pp. E5213–E5222.
8. Gnonlonfin G. J. B., Sanni A., Brimer L. Review. Scopoletin – A coumarin phytoalexin with medicinal properties. *Critical Review in Plant Sciences*, 2012, vol. 31, pp. 47–56.
9. Beyer S. F., Beesley A., Rohmann P. F., Schultheiss H., Conrath U., Langenbach C. J. The Arabidopsis non-host defence-associated coumarin scopoletin protects soybean from Asian soybean rust. *The Plant Journal*, 2019, vol. 99, pp. 397–413.
10. Reen F. J., Gutiérrez-Barranquero J. A., Parages M. L., O’Gara F. Coumarin: A novel player in microbial quorum sensing and biofilm formation inhibition. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, vol. 102, no. 5, pp. 2063–2073.
11. Roy R., Tiwari M., Donelli G., Tiwari V. Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. *Virulence*, 2018, vol. 9, no. 1, pp. 522–554.
12. Kayser O., Kolodziej H. Antibacterial activity of simple coumarins: Structural requirements for biological activity. *Zeitschrift für Naturforschung*, 1999, vol. 54, no. 3-4, pp. 169–174.
13. Makhloufi-Chebli M., Hamdi M., Silva A. M. S., Balegroune F. Translactonisation intramoléculaire assistée par micro-ondes. Synthèse des coumarines. *Journal of the Algerian Chemical Society*, 2008, vol. 18, no. 1, pp. 91–101.
14. De March P. Moreno-Manas M., Roca J. L. The reactions of 4-hydroxy-2-pyrones with 2-hydroxybenzaldehydes. A Note of Warning. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 1984, vol. 21, no. 5, pp. 1371–1372.
15. Kostova I. Synthetic and natural coumarins as anti-oxidants. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 2006, vol. 6, no. 4, pp. 365–374.
16. Lin Y., Sun X., Yuan Q., Yan Y. Combinatorial biosynthesis of plant-specific coumarins in bacteria. *Metabolic Engineering*, 2013, vol. 18, no. 12, pp. 69–77.
17. Baldani V. L. D., Baldani J. I., Döbereiner J. Effect of *Azospirillum* inoculation on root infection and nitrogen incorporation in wheat. *Canadian Journal of Microbiology*, 1983, vol. 29, pp. 924–929.
18. Santos Ferreira N. dos, Hayashi Sant’Anna F., Massena Reis V., Ambrosini A., Gazolla Volpiano C., Rothballer M., Schwab S., Baura V. A., Balsanelli E., Oliveira Pedrosa F. de, Passaglia L. M. P., Souza E. M. de, Hartmann A., Cassan F., Zilli J. E. Genome-based reclassification of *Azospirillum brasilense* Sp245 as the type strain of *Azospirillum baldaniorum* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2020, vol. 70, no. 12, pp. 6203–6212.
19. Konnova S. A., Skvortsov I. M., Makarov O. E., Ignatov V. V. Characteristics of polysaccharide complexes produced by *Azospirillum brasilense* and of the polysaccharides derived from them. *Microbiology*, 1994, vol. 63, pp. 1020–1030.
20. *Metody obshchei bakteriologii: v 3 t. Pod red. F. Gerkhartda* [Gerhardt F., ed. Methods of General Bacteriology]. Moscow, Mir Publ., 1983. Vol. 1. 420 p. (in Russian).
21. Guliy O. I., Velichko N. S., Fedonenko Y. P., Bunin V. D. Use of an electro-optical sensor and phage antibodies for immunodetection of *Herbaspirillum*. *Talanta*, 2019, vol. 202, pp. 362–368.
22. Guliy O. I., Bunin V. D. Electro-optical analysis as sensing system for detection and diagnostics of bacterial cells. In: *Biointerface Engineering: Prospects in Medical Diagnostics and Drug Delivery*. Singapore, Springer, 2020, pp. 233–254.
23. Guliy O. I., Matora L. Y., Burygin G. L., Dykman L. A., Ignatov V. V., Ignatov O. V. Electrooptical properties of the microbial suspensions during a cell’s interaction with the antibodies of a different specificity. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2010, vol. 46, no. 1, pp. 61–64.



24. Dubois M., Gilles K. A., Gamillor J. K., Rebers P. Q., Smitli F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 1956, vol. 28, no. 3, pp. 350–356.
25. Del Gallo M., Haegi A. Characterization and quantification of exocellular polysaccharides in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*. *Symbiosis*, 1990, vol. 9, pp. 155–161.
26. Sawadecker J. S., Sloneker J. H., Jeanes A. Quantative determination of monosaccharides as their alditol acetates by gas liquid chromatography. *Analytical Chemistry*, 1965, vol. 37, pp. 1602–1603.
27. O'Toole G. A. Kolter R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: A genetic analysis. *Molecular Microbiology*, 1998, vol. 28, no. 3, pp. 449–461.
28. Smyth T., Ramachandran V. N., Smyth W. F. A study of the antimicrobial activity of selected naturally occurring and synthetic coumarins. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2009, vol. 33, no. 5, pp. 421–426.
29. Shelud'ko A. V., Filip'echeva Yu. A., Telesheva E. M., Burov A. M., Evstigneeva S. S., Burygin G. L., Petrova L. P. Characterization of carbohydrate-containing components of *Azospirillum brasilense* Sp245 biofilms. *Microbiology*, 2018, vol. 87, no. 5, pp. 610–620.
30. Burdman S., Jurkevitch E., Soria-Díaz M. E., Serrano A. M. G., Okon Y. Extracellular polysaccharide composition of *Azospirillum brasilense* and its relation with cell aggregation. *FEMS Microbiology Letters*, 2000, vol. 189, no. 2, pp. 259–264.
31. Fraysse N., Couderc F., Poinso V. Surface polysaccharides involvement in establishing the rhizobium-legume symbiosis. *European Journal of Biochemistry*, 2003, vol. 270, pp. 1365–1380.
32. Fischer S. E., Miguel M. J., Morri G. B. Effect of root exudates on the polysaccharide composition and the lipopolysaccharide profile of *Azospirillum brasilense* Cd under saline stress. *FEMS Microbiology Letters*, 2003, vol. 219, pp. 53–62.
33. Kanevskiy M. V., Konnova S. A., Boyko A. S., Fedonenko Y. P., Sigida E. N., Ignatov V. V. Effect of flavonoids on the composition of surface glycopolymers of *Azospirillum lipoferum* Sp59b. *Microbiology*, 2014, vol. 83, no. 1, pp. 15–22.

Поступила в редакцию 31.01.2022; одобрена после рецензирования 05.02.2022; принята к публикации 07.02.2022  
The article was submitted 31.01.2022; approved after reviewing 05.02.2022; accepted for publication 07.02.2022