



15. Ефимов Р. В., Аникин В. В., Дёмин А. Г. Секвенирование митохондриального гена цитохромоксидазы 1 (CO1) *Metriotes lutarea* (Hw., 1828) (Lepidoptera, Coleophoridae) // Энтомологические и паразитологические исследования в Поволжье : сб. науч. тр. Саратов, 2006. Вып. 5. С. 8–10.
16. Аникин В. В. Использование методов ДНК-диагностики в зоологии // Нанобиотехнология : проблемы и перспективы : IV Всерос. шк.-семинар для студ., аспирантов и молодых ученых / под ред. О. Е. Лебедевой. Белгород, 2011. С. 26–29.
17. Аникин В. В., Кнушевицкая М. В. Степень изученности представителей семейства молей-чехлоносок (Lepidoptera, Coleophoridae) на базе молекулярных исследований // Энтомологические и паразитологические исследования в Поволжье : сб. науч. тр. Саратов, 2011. Вып. 9. С. 23–25.
18. Аникин В. В., Кнушевицкая М. В. Применение молекулярных методов исследований в систематике и филогении молей-чехлоносок (Lepidoptera, Coleophoridae) // Материалы XIV съезда Рус. энтомол. о-ва. Санкт-Петербург, 27 авг. – 1 сент. 2012. СПб., 2012. С. 22.
19. Hall T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT // Nucl. Acids. Symp. Ser. 1999. Vol. 41. P. 95–98.
20. Hebert P. D. N., Cywinska A., Ball Sh. L., Waard de J.R. Biological identifications through DNA barcodes // Proc. R. Soc. London B. 2003. Vol. 270. P. 313–321.
21. Ivanova N. V., Waard J. de, Hebert P. D. N. An inexpensive, automation-friendly protocol for recovering high-quality DNA // Molecular Ecology Notes. 2006. Vol. 6. P. 998–1002.
22. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. MEGA5 : Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods // Molecular Biology and Evolution (submitted). 2011. Vol. 28, № 10. P. 2731–2739.
23. Huelsenbeck J. P., Ronquist F. MRBAYES : Bayesian inference of phylogeny // Bioinformatics. 2001. Vol. 17. P. 754–755.
24. Ronquist F., Huelsenbeck J. P. MRBAYES 3 : Bayesian phylogenetic inference under mixed models // Bioinformatics. 2003. Vol. 19. P. 1572–1574.
25. Tavaré S. Some Probabilistic and Statistical Problems in the Analysis of DNA Sequence // Lectures on Mathematics in the Life Sciences. 1986. Vol. 17. P. 57–86.
26. Tamura K., Nei M., Kumar S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method // Proceedings of the National Academy of Sciences (USA). 2004. Vol. 101. P. 11030–11035.
27. Zhetsky A., Nei M. A simple method for estimating and testing minimum evolution trees // Molecular Biology and Evolution. 1992. Vol. 9. P. 945–967.
28. Jones D. T., Taylor W. R., Thornton J. M. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. // Computer Applications in the Biosciences. 1992. Vol. 8. P. 275–282.

УДК 577.151

## ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА ЛИГНИН-ПЕРОКСИДАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ ЭНДОФИТНОГО И ЭПИФИТНОГО ШТАММОВ *AZOSPIRILLUM BRASILENSE*

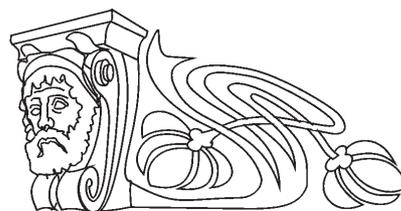
В. Е. Никитина, М. А. Купряшина, С. В. Петров\*, Е. В. Глинская\*

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов

E-mail: nikitina@ibppm.sgu.ru

\*Саратовский государственный университет

E-mail: elenavg-2007@yandex.ru



Установлено различие в лигнин-пероксидазной активности эндофитного и эпифитного штаммов бактерий рода *Azospirillum*. Выявлена зависимость активности лигнин-пероксидазы от возраста культуры, температуры выращивания, присутствия источников азота и углерода в среде культивирования. Обнаружено стимулирование активности лигнин-пероксидазы соединением ароматической природы.

**Ключевые слова:** лигнин-пероксидаза, *Azospirillum brasiliense*, эндофитный и эпифитный штаммы, условия культивирования.

### Influence Conditions of Cultivation on Lignin Peroxidase Activity of Endophytic and Epiphytic Strains *Azospirillum Brasiliense*

V. E. Nikitina, M. A. Kupryashina, S. V. Petrov, E. V. Glinskaya

Differences in lignin-peroxidase activity between the endophytic and epiphytic strains of bacteria of the genus *Azospirillum* has been demonstrated. Dependence of The lignin-peroxidase activity was found



to depend on the age of culture, temperature of the cultivation, presence of the sources of nitrogen and carbonium in medium. The introduction in the cultivation medium of aromatic compound was found to increase lignin-peroxidase activity.

**Key words:** lignin peroxydase, *Azospirillum brasilense*, endophytic and epiphytic strains, culture conditions.

Лигнин-пероксидаза – фенолоксидаза, обладающая высокой окислительной способностью и низкой специфичностью действия, способная катализировать окисление большого количества органических соединений, включая полифенолы, метоксизамещенные фенолы, хлорфенолы, диамины, гетероциклические, алициклические соединения. Впервые лигнин-пероксидаза была выделена из культуральной жидкости *Phanerochaete chrysosporium* [1]. Фермент относительно хорошо изучен у многих видов базидиомицетов, однако о наличии лигнин-пероксидазы у бактерий существуют очень немногочисленные сведения. Относительно недавно Никитиной с соавторами [2] впервые обнаружена лигнин-пероксидазная активность у ряда штаммов бактерий рода *Azospirillum*.

Азоспириллы, начиная с 80-х гг. прошлого века, являются наиболее интенсивно исследуемыми микроорганизмами, осуществляющими тесное взаимодействие с корнями растений. Важнейшим свойством азоспирилл является их способность образовывать ассоциативные и эндوفитные симбиозы со многими высшими растениями и стимулировать их рост и развитие, фиксируя азот атмосферы, продуцируя и выделяя в почву фитогормоны и ряд других физиологически активных соединений [3]. Колонизация корневой системы растений азоспириллами осуществляется различными способами. Одни локализуются только на поверхности корневой системы растений, другие способны проникать внутрь корня, не образуя каких-либо специализированных структур. С помощью электронной микроскопии и визуализации бактерий с использованием иммунозолотого мечения было выявлено присутствие бактерий штамма *Azospirillum brasilense* Sp245 в клетках и в межклетниках проводящей системы корня пшеницы [4]. Результаты сканирующей конфокальной лазерной микроскопии и визуализации бактерий с помощью флуоресцентно меченных олигонуклеотидных зондов позволили обнаружить клетки *A. brasilense* Sp245 внутри корневого волоска. Клетки другого штамма – *Azospirillum brasilense* Sp7 имели только поверхностный тип колонизации и не обнаружены во внутренних тканях корня. Механизм проникновения азоспирилл внутрь корня не известен. Не исключено, что в

этом процессе, наряду с другими ферментными системами, участвуют лигнин-пероксидазы бактерий. Кроме того, адаптационные возможности бактерий, находящихся внутри и на поверхности корня неодинаковы. Поэтому велика вероятность влияния условий культивирования бактерий на активность лигнин-пероксидазы в зависимости от характера их жизнедеятельности.

В связи с вышеизложенным целью настоящей работы явилось сравнительное исследование влияния условий культивирования на активность лигнин-пероксидазы эндوفитного и эпифитного штаммов азоспирилл.

### Материалы и методы

Для настоящего исследования в качестве объектов нами были выбраны штаммы из коллекции микроорганизмов ИБФРМ РАН: *A. brasilense* Sp245, обладающий способностью к колонизации внутренней части корней пшеницы, и *A. brasilense* Sp7, подобной способностью не обладающий. Контрольные значения активности лигнин-пероксидазы получали при культивировании бактерий на жидкой малатной среде при температуре 37°C (г/л):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0.1;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 0.4;  $\text{NaCl}$  – 0.1;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0.002;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0.2;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0.02; яблочная кислота – 5;  $\text{NaOH}$  – 1.7;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  – 1;  $\text{CaCl}_2$  – 0.02;  $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} \cdot \text{CaCl}_2$  – 0.02 (pH=6.8) [5].

Посевным материалом служила 12-часовая культура, выращенная на среде того же состава. При изучении влияния температурного фактора на активность фермента был выбран диапазон культивирования от 22 до 37°C с шагом измерения в 5°.

В качестве индуктора в среду культивирования вносили 2 мМ вератриловый спирт.

Активность лигнин-пероксидазы определяли по скорости окисления вератрилового спирта до вератрилового альдегида при длине волны 310 нм [6]. За единицу активности принимали количество фермента, катализирующего превращение 1 мМ субстрата за 1 мин на мг белка. Концентрацию белка определяли по методу Бредфорд [7].

Полученные результаты подвергали статистической обработке.

### Результаты и их обсуждение

В результате проведенных экспериментов выявлено, что лигнин-пероксидазная активность зависела от стадии роста бактерий. Так, максимальная ферментативная активность как у *A. brasilense* Sp245, так и у *A. brasilense* Sp7 наблюдалась через 24 ч культивирования, что соответствует логарифмической стадии роста бактерий (рис. 1).

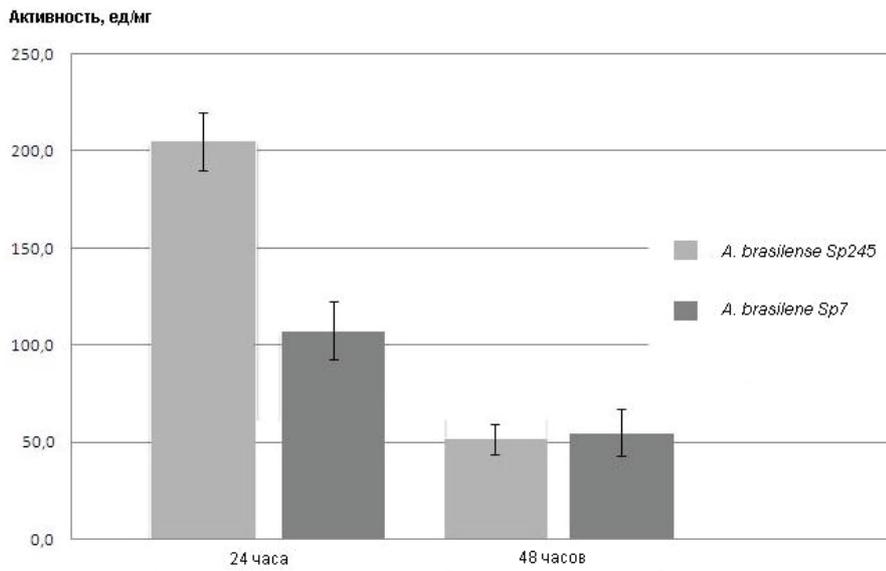


Рис. 1. Зависимость активности лигнин-пероксидазы от времени культивирования

При этом необходимо отметить более высокую ферментативную активность эндофитного штамма по сравнению с эпифитом. Интересным представляется факт, что лигнин-пероксидазная активность культуры проявляется в период первичного роста, тогда как ранее исследованная нами активность марганец-зависимой пероксидазы возрастала в период вторичного роста в ответ на недостаток в среде питательных веществ [8].

При изучении влияния температурного фактора на активность фермента был выбран диапазон от 22 до 37 °С. Как видно из графика (рис. 2), лигнин-пероксидазная активность штамма *A. brasilense* Sp245 возрастала прямо пропорционально увеличению температуры культивирования, однако *A. brasilense* Sp7 проявлял повышенную ферментативную активность при 22 °С. Полученный результат свидетельству-

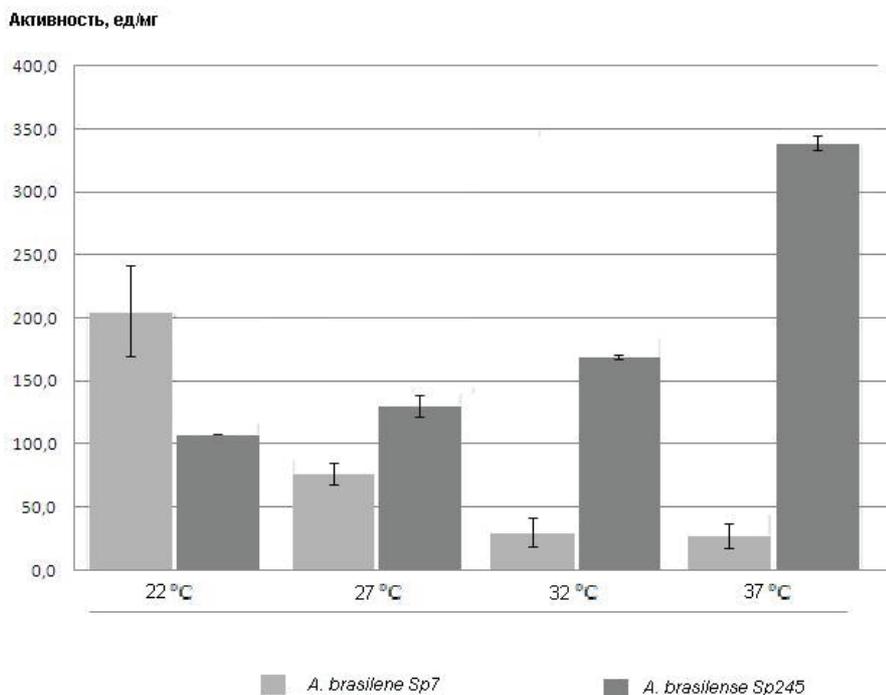


Рис. 2. Зависимость лигнин-пероксидазной активности от температуры культивирования



ет о том, что, по-видимому, различные штаммы азоспирилл проявляют существенную гетерогенность клеток по лигнинолитической активности в различных условиях, внутри растения или в ризосфере.

Известно, что для фенолоксидаз грибного происхождения характерно увеличение активности фермента при культивировании на бедной по азоту среде [9]. Изменение в среде культивирования соотношения С:N оказывало различное влияние на активность лигнин-пероксидазы азоспирилл. Так, высокие значения соотношения С:N (дефицит азота) приводили к заметному росту лигнин-пероксидазной активности *A. brasilense* Sp7, но не влияли на ферментативную активность *A. brasilense* Sp245.

Ранее нами показано, что активность фенолоксидаз стимулируется внесением в среду выращивания соединений ароматической природы [9]. По данным литературы, лигнинолитические ферменты обладают достаточно широкой специфичностью по отношению к низкомолекулярным субстратам [8]. Типичным специфическим субстратом лигнин-пероксидазы является вератриловый спирт – вторичный мета-

болит растений, образование которого связано с процессом разложения лигнина. Кроме того, он является одним из главных индукторов лигнин-пероксидазы. Внесение в среду культивирования азоспирилл 2 мМ вератрилового спирта приводило к увеличению лигнин-пероксидазной активности. Ферментативная активность *A. brasilense* Sp245 увеличивалась практически в 2 раза, а *A. brasilense* Sp7 в 4 раза по сравнению с контролем (рис. 3). Культивирование *A. brasilense* Sp7 в присутствии индуктора на среде, бедной по азоту и углероду, не приводило к существенному увеличению ферментативной активности, тогда как активность лигнин-пероксидазы *A. brasilense* Sp245 достоверно превышала контрольные значения. При внесении 2 мМ вератрилового спирта на фоне дефицита источника углерода в среде культивирования наблюдалось повышение активности фермента в 2.5 раза у эндофитного и в 6 раз у эпифитного штамма, по сравнению со средой аналогичного состава без индуктора. Таким образом, вератриловый спирт стимулирует активность бактериальной лигнин-пероксидазы, что согласуется с данными для грибных объектов [10].

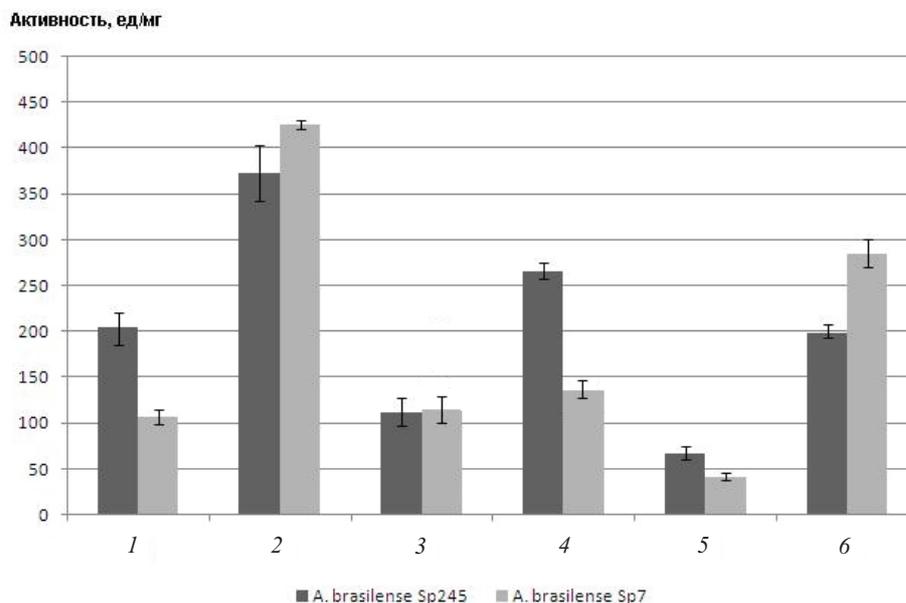


Рис. 3. Зависимость лигнин-пероксидазной активности азоспирилл от присутствия индуктора в среде культивирования: 1 – немодифицированная среда культивирования, 2 – среда с индуктором, 3 – среда бедная по азоту и углероду, 4 – среда бедная по азоту и углероду с индуктором, 5 – среда с дефицитом источника углерода, 6 – среда с дефицитом источника углерода с индуктором

Проведенные исследования выявили различия в активности лигнин-пероксидазы эндофитного и эпифитного штаммов азоспирилл, обусловленные, в частности, адаптивными

возможностями культур к условиям существования в различных экологических нишах. Более высокие значения лигнин-пероксидазной активности и её высокий температурный оптимум,



по-видимому, связанный с экзотермическими реакциями разложения ароматических веществ (в том числе лигнина), косвенно подтверждает взаимосвязь данного фермента с проникающей способностью *A. brasilense* Sp245.

#### Список литературы

1. Tien M., Kirk T. K. Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* // Science. 1983. Vol. 221. P. 661–663.
2. Никитина В. Е., Ветчинкина Е. П., Пономарева Е. Г., Гоголева Ю. В. Фенолоксидазная активность бактерий рода *Azospirillum* // Микробиология. 2010. Т. 79, № 3. С. 344–351.
3. Bashan Y., Holguin G., Bashan L. E. *Azospirillum*-plant relationships : physiological, molecular, agricultural and environmental advances (1997–2003) // Can. J. Microbiol. 2004. Vol. 50, № 8. P. 521–577.
4. Schloter M., Hartmann A. Endophytic and surface colonization of wheat roots (*Triticum aestivum*) by different *Azospirillum brasilense* strains studied with strain specific monoclonal antibodies // Symbiosis. 1998. Vol. 25. P. 159–179.
5. Sadasivan L., Neyra C. A. Flocculation in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum* : exopolysaccharides and cyst formation // J. Bacteriol. 1985. Vol. 163, № 2. P. 716–723.
6. Orth A. B., Royse D. J., Tien M. Ubiquity of lignin-degrading peroxidases among various wood-degrading fungi // Appl. Envir. Microb. 1993. Vol. 59, № 12. P. 4017–4023.
7. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microorganisms qualities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. 1976. Vol. 72. P. 248–254.
8. Купряшина М. А., Селиванов Н. Ю., Никитина В. Е. Выделение и очистка Mn-пероксидазы *Azospirillum brasilense* Sp 245 // Прикладная биохимия и микробиология. 2012. Т. 48, № 1. С. 23–26.
9. Ахмедова З. Р. Лигнинолитические ферменты базидиальных грибов. Лигнин-пероксидазы гриба *Pleurotus ostreatus* УзБИ-ZAX 108. I. Оптимизация ферментообразования и получение препаратов лигниназа // Биохимия. 1996. Т. 61, № 8. С. 1375–1384.
10. Ахмедова З. Р. Лигнинолитические ферменты базидиальных грибов. Лигнин-пероксидазы гриба *Pleurotus ostreatus* УзБИ-ZAX 108. II. Выделение, очистка и характеристика изоферментов // Биохимия. 1996. Т. 61, № 8. С. 1385–1394.

УДК 579.22

## ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ЛЕКТИНОВ АЗОСПИРИЛЛ НА ОБРАЗОВАНИЕ ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА В КОРНЯХ ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ

С. А. Аленькина\*, К. А. Трутнева\*\*, В. А. Великов\*<sup>\*\*\*</sup>, В. Е. Никитина\*

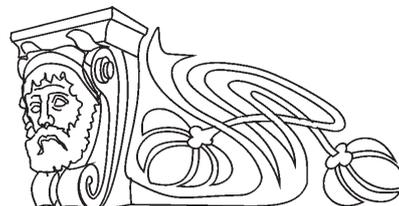
\* Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов

\*\* Саратовский государственный университет

E-mail: alenkina@ibppm.sgu.ru

Показана способность лектинов, выделенных с поверхности почвенных азотфиксирующих бактерий штамма *Azospirillum brasilense* Sp7 и его мутанта по лектиновой активности *Azospirillum brasilense* Sp7.2.3, регулировать продукцию перекиси водорода в корнях проростков пшеницы, связанную с активацией супероксиддисмутазы, пероксидазы, оксалатоксидазы и ингибированием активности каталазы. Было показано, что в корнях проростков пшеницы при воздействии лектинов наиболее быстро индуцируемым путем образования перекиси водорода является активация оксалатоксидазы. Полученные данные свидетельствуют о том, что лектины азоспирилл способны выступать в качестве индукторов адаптационных процессов корней проростков пшеницы.

**Ключевые слова:** *Azospirillum brasilense*, лектины, корни проростков пшеницы, оксалатоксидаза, пероксидаза, супероксиддисмутатаза, каталаза.



### Study of the Effect of *Azospirillum* Lectins on the Formation of Hydrogen Peroxide in Wheat Seedling Roots

S. A. Alen'kina, K. A. Trutneva, V. A. Velikov, V. E. Nikitina

We show that the lectins isolated from the surface of the nitrogen-fixing soil bacterium *Azospirillum brasilense* Sp7 and its mutant defective in lectin activity, *A. brasilense* Sp7.2.3., can regulate the production of hydrogen peroxide in wheat seedling roots, which is associated with the activation of superoxide dismutase, peroxidase and oxalate oxidase, as well as with the inhibition of catalase activity. We show that activation of oxalate oxidase is the most rapidly inducible pathway for the formation of hydrogen peroxide in wheat seedling roots under the effect of lectins. The obtained