

## ВЛИЯНИЕ ФЕРУЛОВОЙ КИСЛОТЫ НА ФЕНОЛОКСИДАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ АЗОСПИРИЛЛ

М.А. Купряшина, В.Е. Никитина

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук, Саратов, Россия, *kupryashina\_m@mail.ru*

**Аннотация.** Показано, что бактерии рода *Azospirillum* способны к деградации феруловой кислоты. Детектировано повышение активности внеклеточных лигнин- и Mn-пероксидаз азоспирилл в присутствии феруловой кислоты в среде культивирования.

**Ключевые слова:** *Azospirillum*, феруловая кислота, Mn-пероксидаза, лигнин-пероксидаза

**DOI:** 10.31255/978-5-94797-319-8-454-457

На сегодняшний день не теряют свою актуальность исследования механизмов взаимодействия симбиотических микроорганизмов с растениями в зоне ризосферы. Известно, что на начальных этапах становления растительно-микробной ассоциации особую роль играют вторичные метаболиты макропартнера [Narula, 2009]. Вещества этой группы являются активаторами или ингибиторами многих обменных процессов, а также наиболее распространенными токсинами. Так, феруловая кислота – вторичный метаболит растений, участвующий в аллелопатических взаимодействиях, оказывает угнетающее действие на почвенную микрофлору, ингибируя бактериальные  $\beta$ -галактозидазы, нитратредуктазы,  $\alpha$ -глюкозидазы и другие ферменты [Borges, 2013; Singh, 2014]. По-прежнему одними из наиболее исследуемых модельных объектов ассоциативного симбиоза являются рост-стимулирующие бактерии рода *Azospirillum* [Fibach-Paldi, 2012]. Ранее нами была обнаружена способность бактерий рода *Azospirillum* к синтезу фенолоксиляющих ферментов [Никитина, 2010; Купряшина, 2012]. Мы предположили, что продукция фенолоксидаз, благодаря кинетическим свойствам данных ферментов, может не только опосредовать проникающую способность эндофитных штаммов бактерий в ткани растения, но и быть связана с механизмами адаптации, повышающими выживаемость, конкурентоспособность ассоциативной бактерии, благодаря возможности окислять и нейтрализовать токсичные фенольные соединения.

Целью данной работы явилось исследование влияния феруловой кислоты на активность пероксидаз фенолоксидазного комплекса почвенных микроорганизмов рода *Azospirillum*.

В качестве объектов были выбраны штаммы *A. brasilense* Sp245 и Sp7 из коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН. Бактерии выращивали на малатно-солевой среде, в опытных вариантах при засеве культуры в среду вносили феруловую кислоту в концентрациях 0,1, 0,5 и 1 мМ. Через 24 и 36 ч отбирались пробы для определения ферментативной активности. Активность ферментов определяли спектрофотометрически: Mn-пероксидазы по скорости окисления 2,6-диметоксифенола ( $\epsilon=30,5 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) при 30 °C [Paszczynski, 1988], лигнин-пероксидазы по скорости окисления вератрилового спирта до вератрового альдегида при длине волны 310 нм ( $\epsilon=9,3 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) [Orth, 1993]. Реакцию начинали добавлением  $\text{H}_2\text{O}_2$ . За единицу активности принимали количество фермента, катализирующего превращение 1 мкМ субстрата за 1 минуту. Удельную активность выражали в единицах на 1 мг белка.

О деградации феруловой кислоты судили по результатам измерений в полистироловых 96-ти луночных планшетах при длине волны 310 нм [Pan, 2002] на иммуноферментном анализаторе Multiskan Ascent с последующей обработкой

результатов с помощью программы Ascent Software for Multiskan Ascent в Центре коллективного пользования научным оборудованием в области физико-химической биологии и нанобиотехнологии «Симбиоз» ИБФРМ РАН.

В ходе проведения работы установлено, что оба исследуемых штамма окисляли феруловую кислоту в диапазоне концентраций: 0,1 мМ, 0,5 мМ и 1 мМ. Уже через восемнадцать часов культивирования отмечался процесс биodeградации феруловой кислоты, о чем свидетельствовали изменения, вызванные накоплением продуктов реакции окисления, подтверждаемые спектрофотометрически.

При изучении динамики активности внеклеточных лигнин- и Mn-пероксидаз при внесении феруловой кислоты в среду культивирования бактерий обнаружено достоверное увеличение активности как лигнин, так и Mn-пероксидазы (рис. 1, 2).

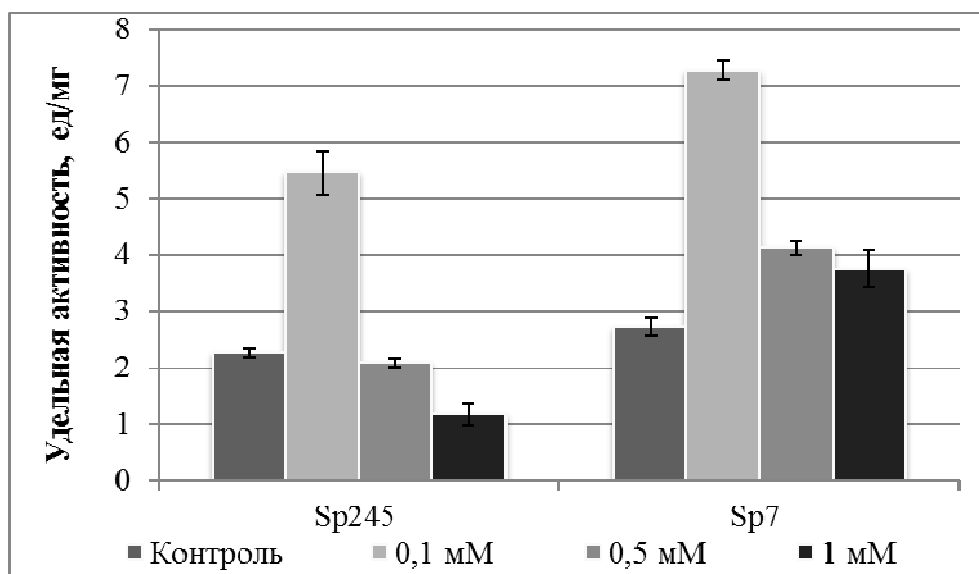


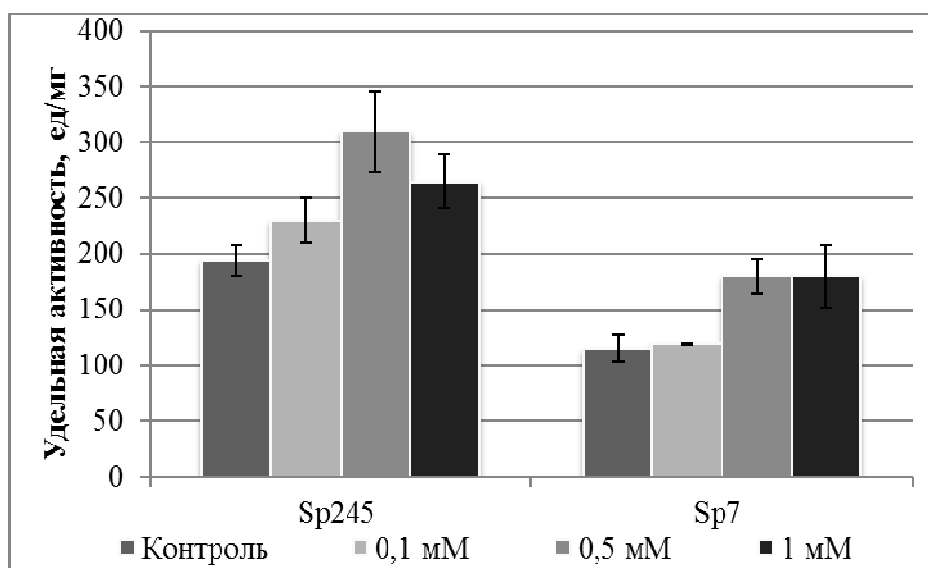
Рис. 1. Удельная Mn-пероксидазная активность (ед/мг) в культуральной жидкости *A. brasilense* Sp245 и *A. brasilense* Sp7 в присутствии феруловой кислоты.

Минимальная из взятых в эксперимент концентрация феруловой кислоты 0,1 мМ стимулировала продукцию внеклеточной Mn-пероксидазы более, чем в два раза. В тоже время увеличение концентрации данного соединения в среде культивирования не оказывало стимулирующего эффекта на ферментативную активность, при этом более высокие концентрации даже ингибировали Mn-пероксидазную активность штамма *A. brasilense* Sp245.

Лигнин-пероксидазная активность как *A. brasilense* Sp245, так и Sp7, повышалась при внесении феруловой кислоты в среду культивирования в концентрациях 0,5 и 1 мМ, при этом существенных штаммовых различий мы не отмечаем (рис. 2).

Таким образом, в результате проведенного исследования было показано, что бактерии рода *Azospirillum* способны к деградации феруловой кислоты, при этом существенных различий между *A. brasilense* Sp7 и Sp245 не выявлено. Показано повышение активности внеклеточных лигнин- и Mn-пероксидаз в присутствии феруловой кислоты в среде культивирования. Анализируя полученные данные, можно предположить, что продукция внеклеточных пероксидаз функционально значима не только для бактерии и позволяет преодолеть фенольный барьер, возникающий в ризосфере, но и для растения-хозяина. Лигнин- и Mn-пероксидазы за счет окислительных реакций могут опосредовать снижение токсичного действия аллелохимических веществ, аккумулирующихся в почве. Известно, что феруловая

кислота ингибирует прорастание семян, рост корней и побегов, деление клеток, уменьшает содержание хлорофилла листьев, ингибирует фотосинтез, вызывает закрытие устьиц за счет снижения тургора и осмотического давления [Esmaeili, 2012; Singh, 2014].



**Рис. 2.** Удельная лигнин-пероксидазная активность (ед/мг) в культуральной жидкости *A. brasilense* Sp245 и *A. brasilense* Sp7 в присутствии феруловой кислоты.

#### Литература

- Купряшина М.А., Селиванов Н.Ю., Никитина В.Е. Выделение и очистка Мп-пероксидазы *Azospirillum brasilense* Sp245 // Прикладная биохимия и микробиология. – 2012. – Т. 48, № 1. – С. 23–26.
- 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.
- Borges A., Ferreira C., Saavedra M.J., Simoes M. Antibacterial activity and mode of action of ferulic and gallic acids against pathogenic bacteria // Microb. Drug. Resist. – 2013. – V. 19. – P. 256–265.
- Esmaeili M., Heidarzade A., Pirdashti H., Esmaeili F. Inhibitory activity of pure allelochemicals on barnyardgrass (*Echinochloa crusgalli* L.) seed and seedling parameters // Int. J. Agri. Crop. Sci. – 2012. – V.4. – P.274–279.
- Fibach-Paldi S., Burdman S., Okon Y. Key physiological properties contributing to rhizosphere adaptation and plant growth promotion abilities of *Azospirillum brasilense* // FEMS Microbiol. Lett. – 2012. – V. 326. – P. 99–108.
- Narula N., Kothe E., Kumar R., Behl R. Role of root exudates in plant–microbe interactions // J. Appl. Botany Food Qual. – 2009. – V. 82. – 122–130.
- Orth A.B., Royse D.J., Tien M. Ubiquity of lignin-degrading peroxidases among various wood-degrading fungi // Appl. Envir. Microb. – 1993. – V. 59. – P. 4017–4023.
- Pan G.X., Thomson C.I., Leary G.J. Uv–vis. spectroscopic characteristics of ferulic acid and related compounds // J. of Wood Chem. and Technol. – 2002. – V. 22, No. 2-3. – P. 137–146.
- Paszczynski R., Crawford V.B. Huynh Manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*: purification // Methods Enzymol. – 1988. – V. 161. – P. 264–270.

Singh H.P., Kaur S., Batish D.R., Kohli R.K. Ferulic acid impairs rhizogenesis and root growth, and alters associated biochemical changes in mung bean (*Vigna radiata*) hypocotyls // J. Plant Interact. – 2014 – V. 9, No. 1. – P. 267–274.

## **INFLUENCE OF FERULIC ACID ON THE PRODUCTION OF PHENOL OXIDASE BY AZOSPIRILLA**

M.A. Kupryashina, V.E. Nikitina

Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms Russian Academy of Sciences, Saratov, Russia, *kupryashina\_m@mail.ru*

**Abstract.** It was shown that bacteria of the genus *Azospirillum* have ability of degrading ferulic acid. We were detected that activity of azospirilla's extracellular lignin- and Mn-peroxidases of increase in the presence of ferulic acid in the culture medium.

**Keywords:** *Azospirillum*, *ferulic acid*, *Mn-peroxidase*, *lignin-peroxidase*