

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«Казанский (Приволжский) Федеральный Университет»
Институт фундаментальной медицины и биологии
Кафедра микробиологии

Направление подготовки: 06.03.01 – Биология

Профиль подготовки: Микробиология и вирусология

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА
ХАРАКТЕРИСТИКА ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ И
ВЛИЯНИЯ НА АНТИОКСИДАНТНУЮ СИСТЕМУ РАСТЕНИЙ
ИЗОЛЯТА ЭНДОФИТНЫХ БАКТЕРИЙ КАРТОФЕЛЯ

Обучающийся 4 курса
группы 01-901
"14" июня 2023 г.



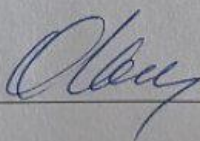
Ким Д.И.

Научный руководитель
канд. биол. наук, доцент
"14" июня 2023 г.



Карамова Н.С.

Заведующий кафедрой
микробиологии
д-р биол. наук, профессор
"14" июня 2023 г.



Ильинская О.Н.

Казань – 2023

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	6
1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	8
1.1 Эндوفитные микроорганизмы и их роль в жизнедеятельности растений	8
1.2 Эндوفиты как агенты биоконтроля патогенных микроорганизмов растений	12
1.3 Гидролитические ферменты микроорганизмов	14
1.3.1 Гликозидазы	14
1.3.2 Протеолитические ферменты	16
1.3.3 Эстеразы	16
1.3.4 Пектиназы	18
1.4 Роль эндوفитных микроорганизмов в регуляции антиоксидантной системы растений	18
1.4.1 Ферментная антиоксидантная система бактерий	18
1.4.2 Антиоксидантная система растений	20
1.4.2.1 Антиоксидантные ферменты	20
1.4.2.2 Неферментные антиоксиданты	21
1.4.2.3 Влияние эндوفитных микроорганизмов на АОС растений	23
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	25
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	25
2.1 Материалы	25
2.1.1 Исследуемый изолят бактерий	25
2.1.2 Питательные среды и растворы	25
2.1.3 Используемые растения	28
2.1.4 Фитопатогенные микроорганизмы	28
2.2 Методы	28
2.2.1 Культивирование бактерий	28

2.2.2 Методы оценки ферментативной активности	28
2.2.2.1 Методы качественной оценки	28
2.2.2.1.1 Тест на уреазную активность	28
2.2.2.1.2 Тест на липазную активность	28
2.2.2.1.3 Амилазная активность	29
2.2.2.1.4 Хитиназная активность	29
2.2.2.1.5 Целлюлазная активность	29
2.2.2.1.6 Протеазная активность	29
2.2.2.1.7 Желатиназная активность	30
2.2.2.1.8 Тест на пектиназную активность	30
2.2.2.2 Методы количественной оценки ферментативной активности	30
2.2.2.2.1 Метод количественной оценки протеазной активности	30
2.2.2.2.2 Метод количественной оценки амилазной активности	31
2.2.3 Методы оценки влияния микроорганизмов на антиоксидантный статус растений картофеля	32
2.2.3.1 Подготовка и культивирование асептических микрорастений картофеля	32
2.2.3.2 Обработка растений картофеля культурами эндофитной бактерии и фитопатогенных грибов	32
2.2.3.2.1 Подготовка суспензий эндофита и фитопатогена	32
2.2.3.2.2 Обработка растений	32
2.2.3.3 Методы оценки антиоксидантной активности	33
2.2.3.3.1 Подготовка экстракта растений	33
2.2.3.3.2 Метод оценки каталазной активности	33
2.2.3.3.3 Метод оценки пероксидазной активности	34
2.2.3.3.4 Количественное определение малонового диальдегида (МДА)	34
2.2.3.3.5 Фосфомолибденовый метод оценки общей антиоксидантной активности	35
2.2.3.4 Количественное определение фотосинтетических пигментов	35

2.2.4 Статистическая обработка результатов	36
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	37
3.1 Скрининг ферментативной ферментативной активности эндофитного изолята с использованием качественных реакций	37
3.2 Количественный анализ ферментативной активности эндофитного изолята в динамике	38
3.2.1 Амилазная активность	38
3.2.2 Протеазная активность	39
3.3 Результаты исследования антиоксидантной активности	41
3.3.1 Каталазная активность	41
3.3.2 Пероксидазная активность	42
3.3.3 Результаты количественного определения малонового диальдегида	44
3.3.4 Фосфомолибденовый метод оценки общей антиоксидантной активности	45
3.4 Количественное определение фотосинтетических пигментов растениях картофеля	46
ВЫВОДЫ	48
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	49

ВВЕДЕНИЕ

Эндوفиты – это микроорганизмы, проводящие весь свой жизненный цикл или его часть внутри растения-хозяина. [Hallmann *et al.*, 1997].

Некоторые виды эндوفитов могут стимулировать рост растений, путем добычи необходимых ресурсов из почвы, синтеза витаминов, поэтому эндوفиты могут способствовать росту и развитию сельскохозяйственных культур, использоваться в садоводстве и цветоводстве, в фиторемедиации для очистки сточных вод, почвы и воздуха [Santoyo *et al.*, 2016]. Эти знания также могут помочь в изучении действия фитогормонов или разработке методов по удалению микрозагрязнителей из почвы и воды, например, ПАГ (полициклические ароматические гидрокарбонаты) или СОЗ (стойкие органические загрязнители) [Karas *et al.*, 2021].

Эндوفиты могут служить основой новых биопрепаратов для сферы сельского хозяйства, что позволит снизить количество используемых минеральных и синтетических удобрений, а также пестицидов и гербицидов, которые имеют негативные последствия для почвы, культурных растений и здоровья человека [Sutton *et al.*, 2011]. Так, например, бактерии рода *Bacillus* хоть и не имеют на данный момент широкого применения из-за непостоянной активности, сильно зависящей от внешних и внутренних условий; являются хорошим инструментом для снижения заболеваемости и увеличения производительности сельскохозяйственных культур [Miljakovic *et al.*, 2020].

Синтезируемые эндобитами гидролитические ферменты имеют огромный потенциал в пищевой и технической промышленности, биотехнологии, при очистке сооружений и реставрации. Также их изучение позволит выделить и исследовать вещества, которые могут быть использованы в качестве основы лекарственных препаратов для лечения болезней человека и животных [Strobel *et al.*, 2004].

Также растения изобилуют различными антиоксидантными соединениями, к синтезу которых в таких количествах человеческий организм

и некоторые виды растений и животных не предрасположены. Данный факт открывает новую область для исследований возможностей по созданию лекарственных антивозрастных препаратов, новых методов борьбы с окислительным стрессом и защите сельскохозяйственных культур от негативного воздействия факторов окружающей среды, таких как засоленность почв, засуха, длительные заморозки [Dumanovic *et al.*, 2021].

Известно, что проникновение во внутренние ткани растений, а также проявление антагонистической активности в отношении фитопатогенов, у эндофитов во многом связано с продукцией различных ферментов. Также в ряде исследований показано влияние эндофитных микроорганизмов на антиоксидантную систему растений-хозяев, активируя её защитные механизмы против патогенов и факторов стресса [Onele *et al.*, 2018].

Целью данного исследования явилась характеристика активности гидролитических ферментов и влияния на антиоксидантную активность растений изолята эндофитных бактерий.

В связи с поставленной целью решались следующие **задачи**:

- 1) Провести скрининг активности гидролитических ферментов эндофитного изолята.
- 2) Оценить амилазную и протеазную активности эндофитного изолята в динамике.
- 3) Охарактеризовать влияние эндофитного изолята на антиоксидантный статус растений картофеля.
- 4) Оценить влияние эндофитного изолята на количественное содержание фотосинтетических пигментов растений картофеля.

ВЫВОДЫ

1) Штамм эндофитных бактерий, выделенный из растений картофеля сорта Регги, обладает желатиназной, пектиназной, целлюлазной, липазной, амилазной, протеазной и хитиназной активностями.

2) Амилазная активность эндофитного штамма достигает 1.42 ед/мл на 24 час роста культуры. Для протеазы эндофитного штамма обнаружено два пика активности 1.24 и 1.18 ед/мл на 40 ч и 72 ч культивирования бактерий.

3) Штамм эндофитных бактерий повышает активность антиоксидантной системы растений картофеля, увеличивая активность каталазы, пероксидазы и неферментативных факторов защиты исследуемых растений. Содержание МДА в растениях, колонизированных эндофитными бактериями, было в 1,5 раза меньше по сравнению с таковым в контроле.

4) Эндофитный штамм вызывает увеличение содержания хлорофилла b и каротиноидов в листьях растений картофеля.