



БОЛЬШИЕ ВЫЗОВЫ

ВСЕРОССИЙСКИЙ КОНКУРС
НАУЧНО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЕКТОВ



Региональный трек
Всероссийского конкурса
научно-технологических проектов

«БОЛЬШИЕ ВЫЗОВЫ»

направление

Агропромышленные и биотехнологии

название работы

**Изучение антибактериальных
свойств эфирных масел**

участник(и)

Сивунова Дана Денисовна

#большиевызовы
#МГК

mgk.olimpiada.ru

г. Москва
2021

Цель: изучить действие эфирных масел и их компонентов на бактериальную клетку с помощью lux-биосенсоров и выявить наиболее эффективного ингибитора роста микроорганизмов.

Задачи:

- 1) Диско-диффузионным методом определить степень ингибирования роста бактерий различными эфирными маслами ;
- 2) Исследовать способность эфирных масел и их компонентов вызывать в клетках окислительный стресс, повреждение ДНК и белков с помощью специфических lux-биосенсоров ;
- 3) Оценить степень воздействия эфирных масел и их компонентов на клетки.

Актуальность

- Изучение эффективности и механизмов воздействия эфирных масел позволит с более высокой точностью предсказывать заболевания растительных сообществ.
- Также это исследование поможет в формировании защиты лесных хозяйств, садов и плантаций.

Действие на клетку стрессовых агентов

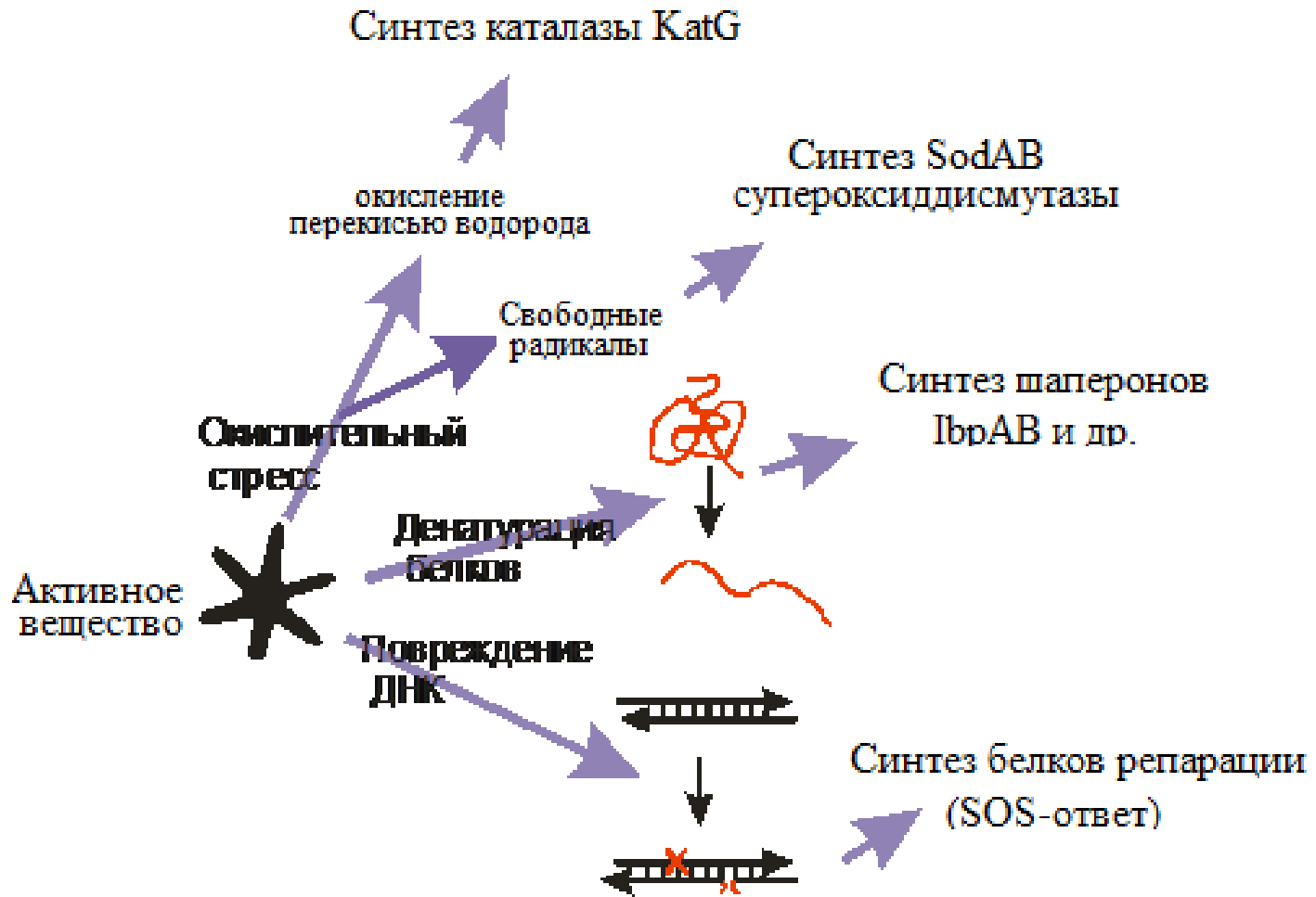
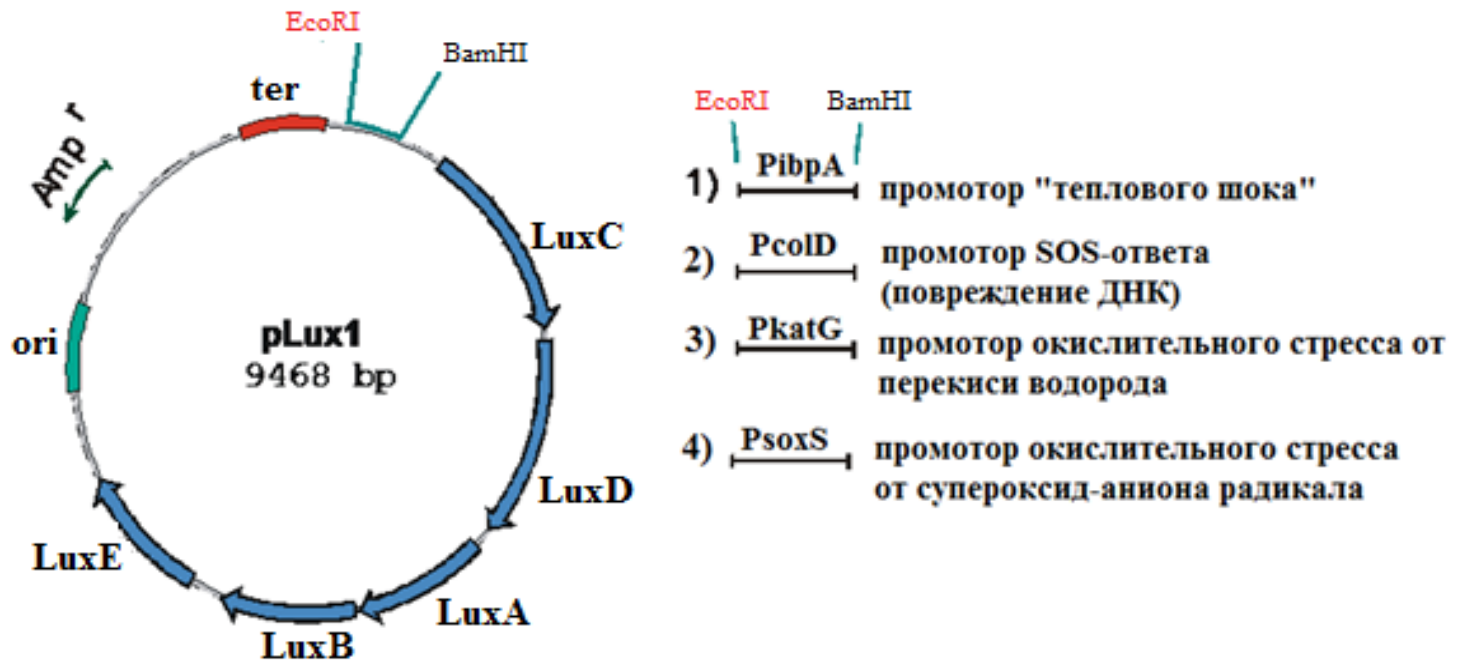


Схема плазмиды lux-биосенсора

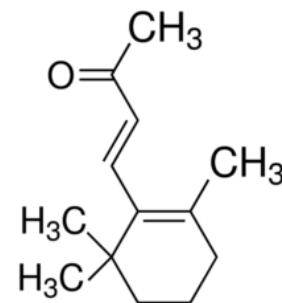
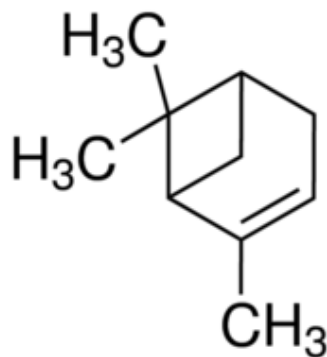
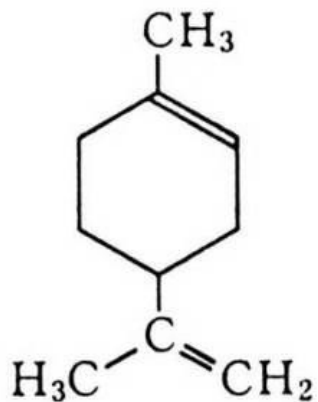
В состав плазмиды входят два основных элемента: регуляторный участок (промотор и оператор) и гены-репортеры (фермент люцифераза).



При воздействии на клетку lux-биосенсора стрессовых агентов происходит индукция специфического промотора, начинается транскрипция генов люциферазы, и клетка начинает люминесцировать. Уровень люминесценции измеряется люминометром.

Исследуемые эфирные масла

Масла	Компоненты	L-Лимонен	α -Пинен	β -Ионон	Прочие компоненты
Лимонное		70,4 %	4,2 %	–	γ -Терпены 11.8%
Сосновое		1.8 %	51 %	–	Камфен 7.4%
Мятное		<1%	–	–	Ментол 55% Ментон 23%
Лавандовое		0.5%	–	<1%	Линалоол 38% Камфора 0.5%



Методика

Диско-диффузионный метод

1. Клетки *R. erithropolis*, *P. fluoresces*, *E. coli*, *B. amyloliquefaciens*, *E. faecalis* или *P. vagans* выращивались в пробирке со средой LB до ранней стационарной фазы (оптическая плотность 0.8-1.0)
2. На чашку Петри с агаризованной средой LB высевали 100мкл бактериальной суспензии для получения сплошного газона
3. На стерильный диск фильтровальной бумаги 12мм в диаметре наносилось 4мкл эфирного масла. Диск клали на чашку Петри с инокулированной исследуемой культурой. Чашку Петри заматывали парафильмом и инкубировали 12 часов при 30°C. Замерялась зона подавления роста.

Методика

Подготовка биосенсора к измерениям

1. Ночную культуру клеток lux-биосенсора (*Escherichia coli* K12 - MG1655) засекали микробиологической петлей в пробирку со средой LB. Клетки выращивались в шейкере-инкубаторе до ранней логарифмической фазы (оптическая плотность – 0.3-0.4) при температуре 37°C (30°C для культуры с плазмидой pIbpA).
2. Готовую культуру клеток переносили в кюветы по 250 мкл и добавляли исследуемые вещества в различных концентрациях. Присутствовала контрольная группа и группа положительного контроля
3. Замерялась интенсивность биолюминесценции в люминометре-фотометре LM01A (Beckman) в течение 2 часов с интервалом в 60 секунд.

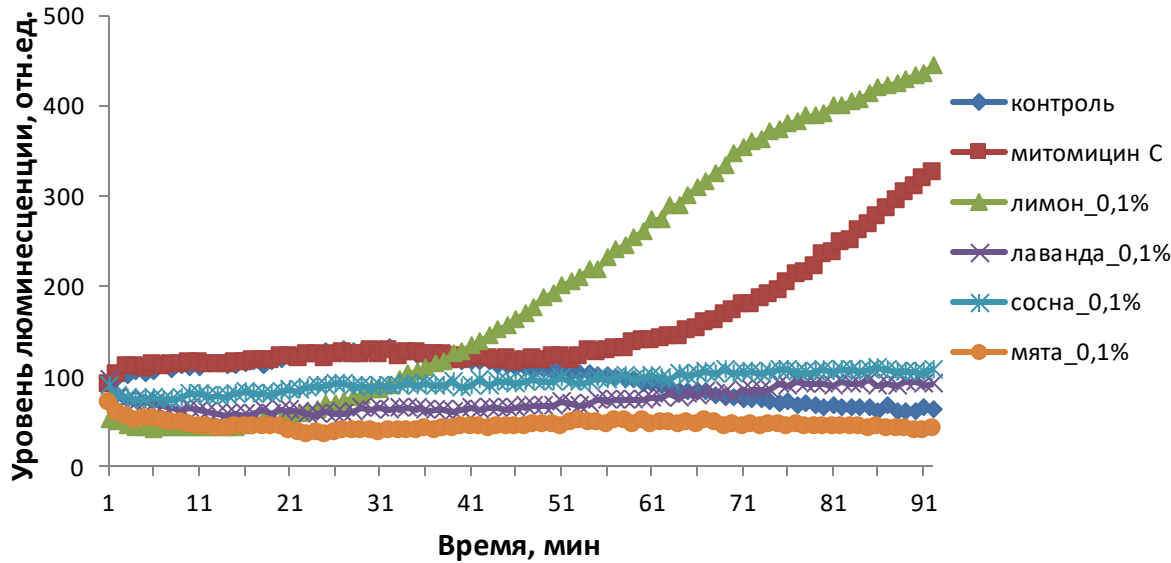
Результаты

Зона подавления роста микроорганизмов

Эфирное масло*	Лимон	Мята	Лаванда	Сосна
Микроорганизм				
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (грам+)	9±1,0мм	6±1,0мм	5±1,0мм	>1мм
<i>Enterococcus faecalis</i> DS16 (грам+)	-	1,5±0,1мм	-	-
<i>Escherichia coli</i> MG1655 (грам-)	5±1,0мм	2±1,0мм	>1мм	1,5±0,1мм
<i>Pantoea vagans</i> (грам-)	1,5±0,1мм	>1мм	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (грам-)	7±1,0мм	2,5±0,5мм	1,5±0,1мм	-
<i>Rhodococcus erythropolis</i> (грам+)	10±2,0мм	8±1,0мм	5±1,0мм	-

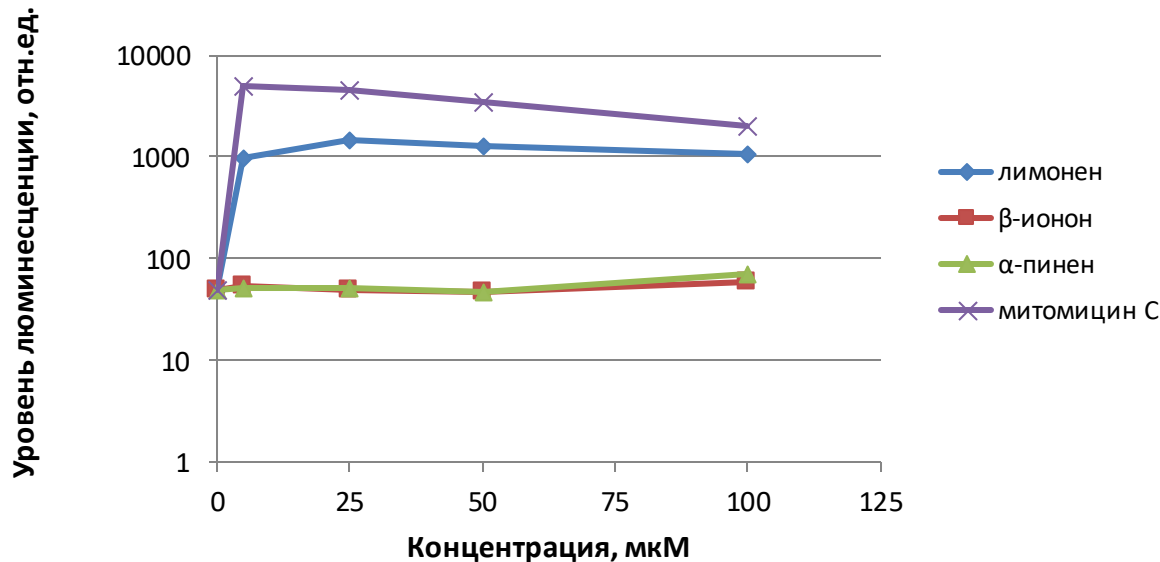
SOS-индуцированный ответ (повреждения ДНК)

SOS-индуцируемый промотор гена *cda*



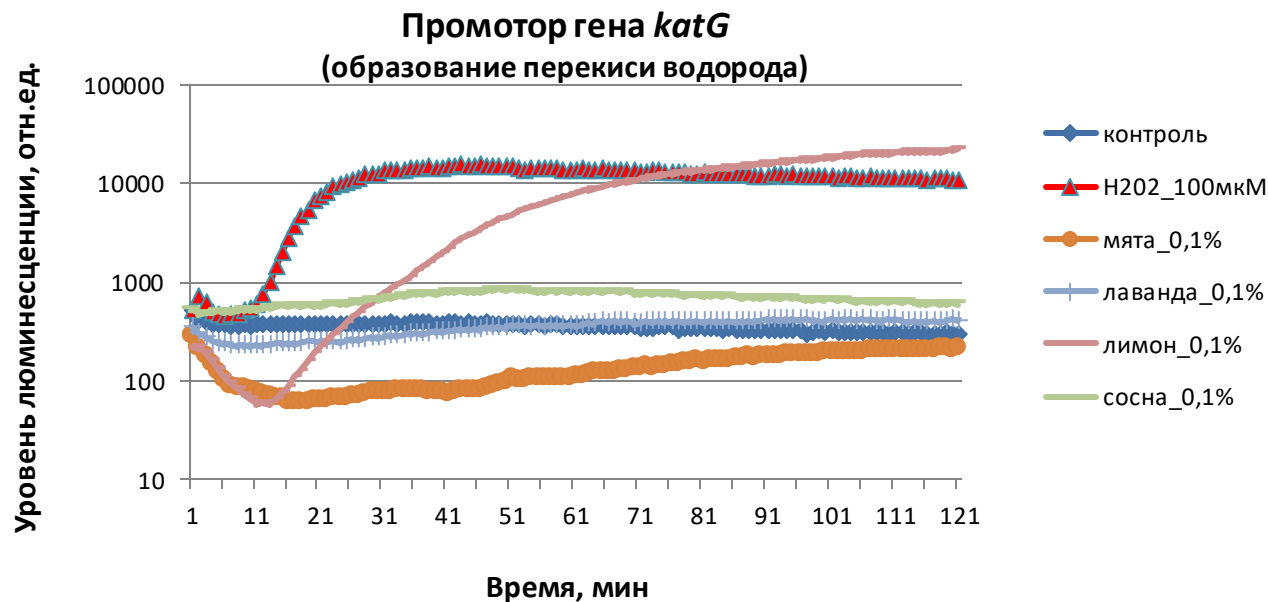
Индукция SOS-ответа при действии на клетки lux-биосенсора *E. coli* MG1655 pCoID различных эфирных масел

Промотор гена *cda* (SOS-ответ, повреждение ДНК)

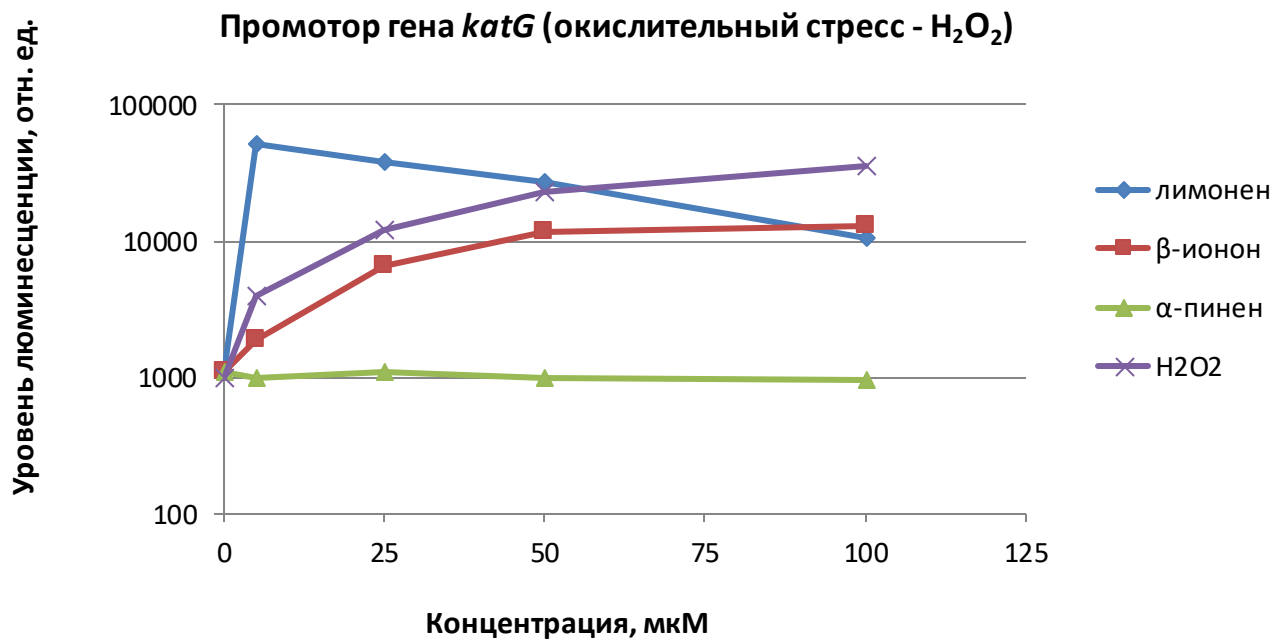


Индукция SOS-ответа при добавлении различных концентраций компонентов эфирных масел

Окислительный стресс (образование перекиси водорода)



Индукция окислительного стресса при действии на клетки lux-биосенсора *E. coli* MG1655 *pkatG* различных эфирных масел

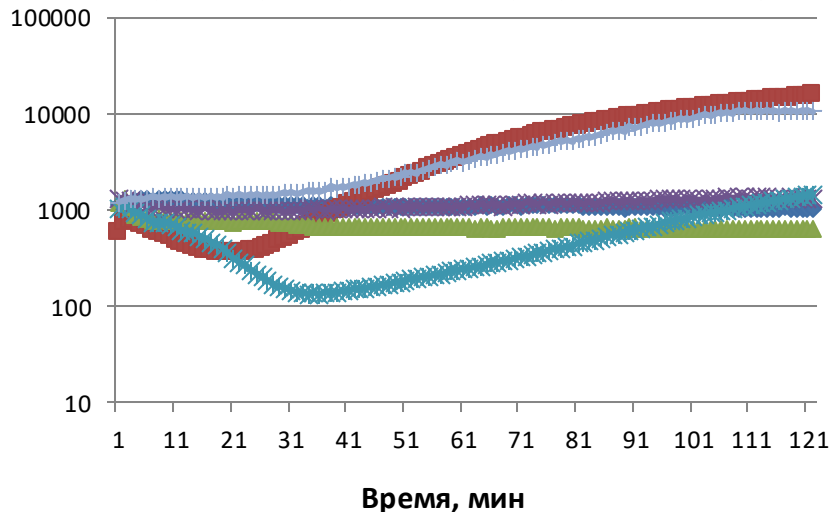


Индукция окислительного стресса в зависимости от концентраций добавленных компонентов эфирных масел

Окислительный стресс (образование супероксид-анион радикала)

Уровень люминесценции, отн. ед.

Промотор гена soxS
(индукция при образовании супероксид-анион радикала)

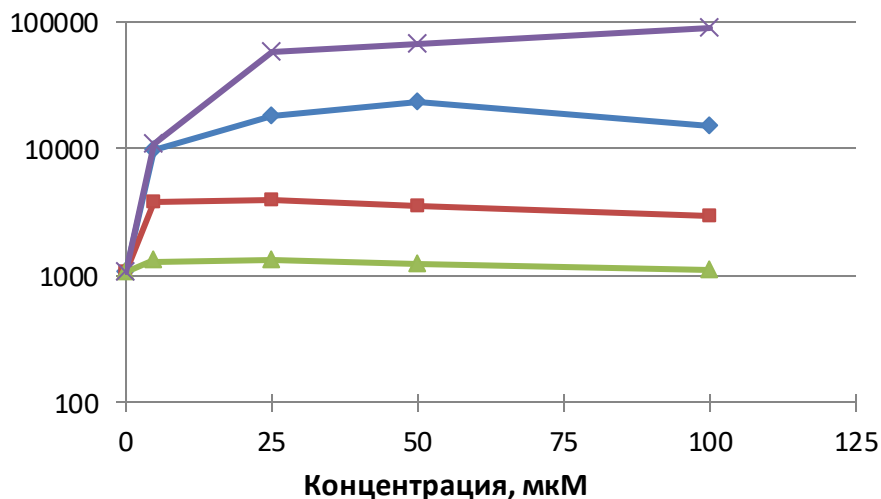


- ♦— контроль
- лимон_0,2%
- ▲— лаванда_0,2%
- ×— сосна_0,2%
- *— мята_0,2%
- +— паракват_5мкМ

Индукция окислительного стресса при действии на клетки lux-биосенсора *E. coli* MG1655 pSoxS различных эфирных масел

Уровень люминесценции, отн. ед.

Промотор гена soxS
(окислительный стресс - супероксид-анион радикал)

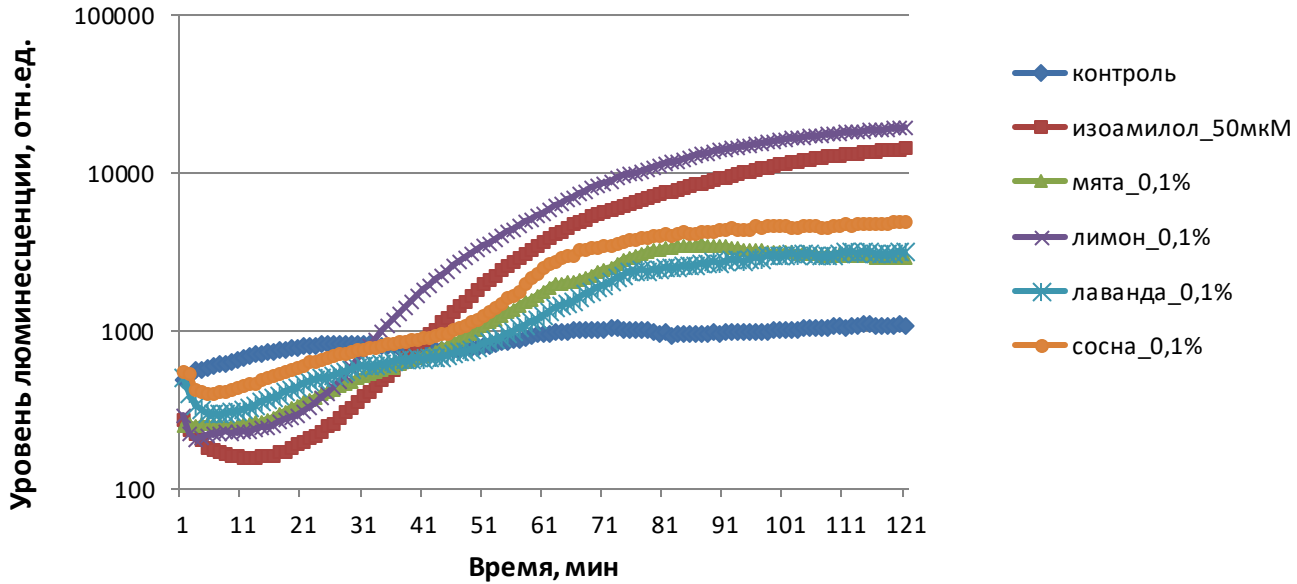


- ♦— лимонен
- β-ионон
- ▲— α-пинен
- ×— паракват

Индукция окислительного стресса в зависимости от концентраций добавленных компонентов эфирных масел

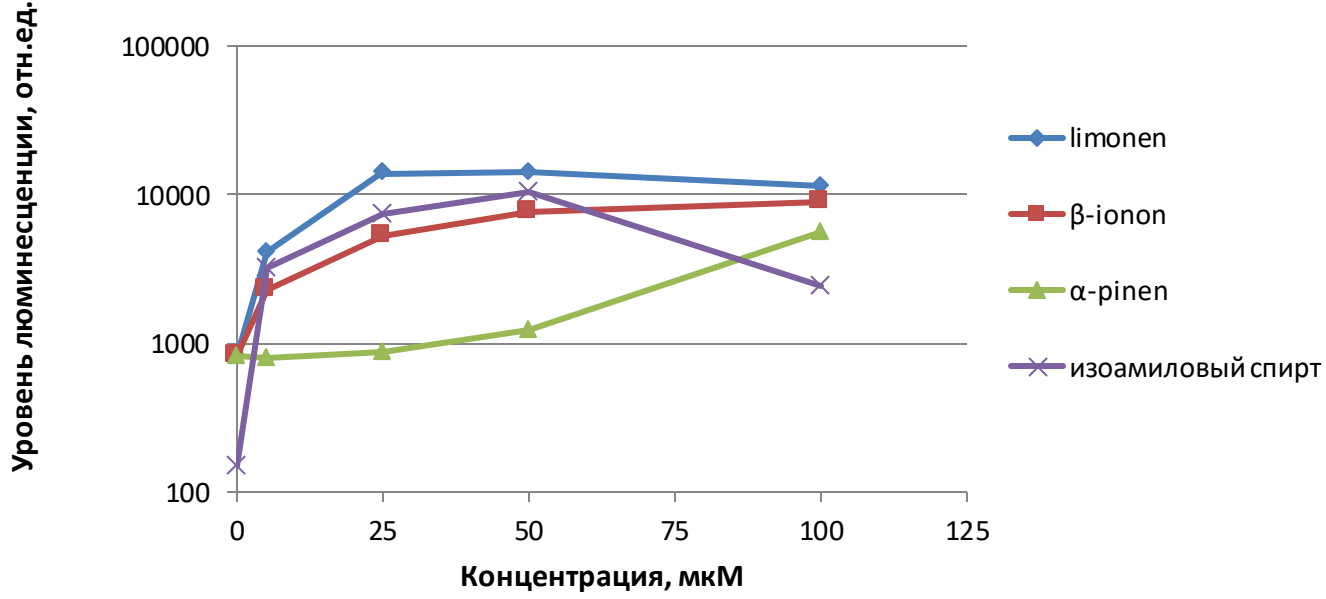
Тепловой шок (денатурация белков)

Промотор гена *lbrA* (ответ на повреждение белков)



Индукция белков «теплового шока» при действии на клетки lux-биосенсора *E. coli* MG1655 рlbrA различных эфирных масел

Промотор гена *lbrA* (тепловой шок, денатурация белков)



Индукция белков «теплового шока» в зависимости от концентраций добавленных компонентов эфирных масел

Выводы

- Показано, что лимонное масло и входящий в его состав лимонен наиболее сильно ингибируют рост бактерий. Лимонен – основной компонент лимонного эфирного масла вызывает комплексные повреждения клетки. Можно сделать вывод об эффективной защите лимонных деревьев от бактериальных фитопатогенов.
- Мятное эфирное масло слабее подавляет рост бактерий. Его добавление вызывает в клетках слабый окислительный стресс. Однако в нем содержится ментоловый спирт, который вызывает повреждения белков. Сочетание воздействий может объяснять большую зону подавления бактерий.
- Лавандовое эфирное масло слабо подавляет рост микроорганизмов. Сосновое эфирное масло почти не подавляет рост бактерий. Можно сделать вывод об уязвимости сосновых лесов перед бактериальными инфекциями.
- α -пинен – основной компонент соснового эфирного масла, при высоких концентрациях вызывает повреждение белков клетки.
- β -ионон – минорный компонент лавандового масла, вызывает окислительный стресс и повреждение белков. Однако его содержание в лавандовом эфирном масле незначительно, и повреждения белков можно связать с содержанием в масле линалоола.
- Среди протестированных бактерий наибольшую устойчивость к действию эфирных масел проявили бактерии *P. vagans*.