

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра биохимии и биофизики

**КОНВЕРСИЯ РУТИНА БАКТЕРИЯМИ
AZOSPIRILLUM BRASILENSE SP7 И SP245**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 421 группы

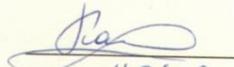
Направления подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология

Биологического факультета

Кошелевой Ирины Сергеевны

Научный руководитель:

доцент, канд. биол. наук


11.06.19

М.В. Каневский

Зав. кафедрой:

профессор, док.биол. наук


11.06.19

С.А. Коннова

Саратов 2019

Введение. Флавоноиды (от лат. *flavus* –желтый)– органические соединения, присутствующие в тканях растений и представленные широким разнообразием структурных форм. Среди всех растительных веществ вторичного происхождения они представляют наибольший интерес, поскольку выполняют ряд важных функций – защищают растения от окислительного стресса и болезнетворных микроорганизмов, являются сигнальными молекулами при формировании растительно-бактериальных ассоциаций. На содержание флавоноидов в почве влияет множество факторов, в том числе и активность почвенных микроорганизмов. По результатам исследований была установлена способность некоторых представителей почвенных бактерий, модифицировать флавоноиды, тем самым влияя на их растворимость и, как следствие, подвижность в почве. Однако в современной литературе практически отсутствует информация о роли бактерий рода *Azospirillum* в миграции флавоноидов в почве.

Объект исследования – граммотрицательный ризосферный микроорганизм *A. brasilense*, классический модельный объект, применяемый при исследовании растительно-бактериальных взаимодействий. В рамках данной работы использовались два штамма азосприлл, отличающихся друг от друга стратегией поведения при формировании ассоциаций с растениями – *A. brasilense* Sp7 и *A. brasilense* Sp245.

Рутин – флавоноид, относящийся к классу флавонолов. Выбор рутина в качестве объекта исследования обусловлен его распространенностью в природе. Также рутин является одним из наиболее известных и хорошо изученных флавоноидов, что позволяет проследить весь путь его распада при наличии соответствующих ферментативных систем у изучаемых микроорганизмов.

Цель работы – выявление способности *A. brasilense* Sp7 и *A. brasilense* Sp245 к модификации рутина.

Для реализации поставленной цели в ходе исследования были сформулированы и решались следующие задачи:

1. Оценить динамику роста *A. brasilense* Sp7 и *A. brasilense* Sp245 в присутствии рутина на богатой и синтетической средах.

2. Оценить динамику роста *A. brasilense* Sp7 и *A. brasilense* Sp245 в присутствии рутина на синтетической среде, лишённой источника углерода.

3. Методами ВЭЖХ и УФ-спектроскопии выявить и сравнить изменения состава фенольных соединений культуральной жидкости *A. brasilense* Sp7 и *A. brasilense* Sp245 в ходе роста на среде с рутином.

Исследование проводилось с использованием методов, адекватных поставленным задачам. Производилось культивирование микроорганизмов в оптимальных для роста условиях. Оценка интенсивности роста культуры осуществлялась с помощью оптических методов. Культуральную жидкость отделяли от клеточной биомассы центрифугированием, полученный супернатант концентрировали на роторном испарителе. Экстракцию проводили поочередно этанолом, ацетоном и этилацетатом с целью получения экстрактов фенольных соединений. Анализ полученных образцов проводился на комплексе для высокоэффективной жидкостной хроматографии с УФ-детектированием.

Структура бакалаврской работы. Работа состоит из введения, основной части, заключения, выводов, списка использованных источников. Литературный обзор составлен на основе анализа 55 источников и включает в себя следующие вопросы: общие сведения о флавоноидах (структура и классификация, биосинтез и пути катаболизма, выполняемые функции), характеристика бактерий рода *Azospirillum*.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В работе были использованы бактерии рода *Azospirillum*, предоставленные коллекцией микроорганизмов ИБФРМ РАН.

Граммотрицательные микроорганизмы *A. brasilense* Sp7 выделены из ризосферы росички лежачей *Digitaria decumbens* (Бразилия).

Граммотрицательные микроорганизмы *A. brasilense* Sp245 выделены из ризосферы пшеницы *Triticum vulgare* (Бразилия).

Поддержание культур исследуемых микроорганизмов проводилось на синтетической малатно-солевой среде (МС), состоящей из фосфатного буфера, солевой основы, малата натрия в качестве источника углерода и хлорида аммония в качестве источника азота. При помощи NaOH (40 г/л) реакцию среды доводили до pH 6.6-6.8. Непосредственно перед стерилизацией в среду добавляли раствор витаминов (тиамин, биотин, пиридоксаль) из расчета 1мл на 1 л среды и раствор хелата железа из расчёта 10 мл на 1 л среды.

Культивирование микроорганизмов проводили на богатой среде LB/2.

Для исследования способности бактерий к конверсии рутин использовали модификации среды МС: МС-1 и МС-2. Среда МС-1 не содержала в своём составе витаминов и солей железа. Среда МС-2 не содержала в своём составе витаминов, солей железа и источника углерода.

Использование среды, лишённой источника углерода, при изучении роста культуры и способности азоспиррилл метаболизировать рутин обусловлено тем, что в природных условиях многие микроорганизмы деградируют флавоноиды, используя их в качестве источника углерода. В питательные среды не добавляли соли железа, во избежание формирования нерастворимых комплексов с флавоноидами.

Среду стерилизовали 30 минут при 121°C.

Рутин растворяли в ДМСО и добавляли в среду выращивания после стерилизации, до внесения инокулята.

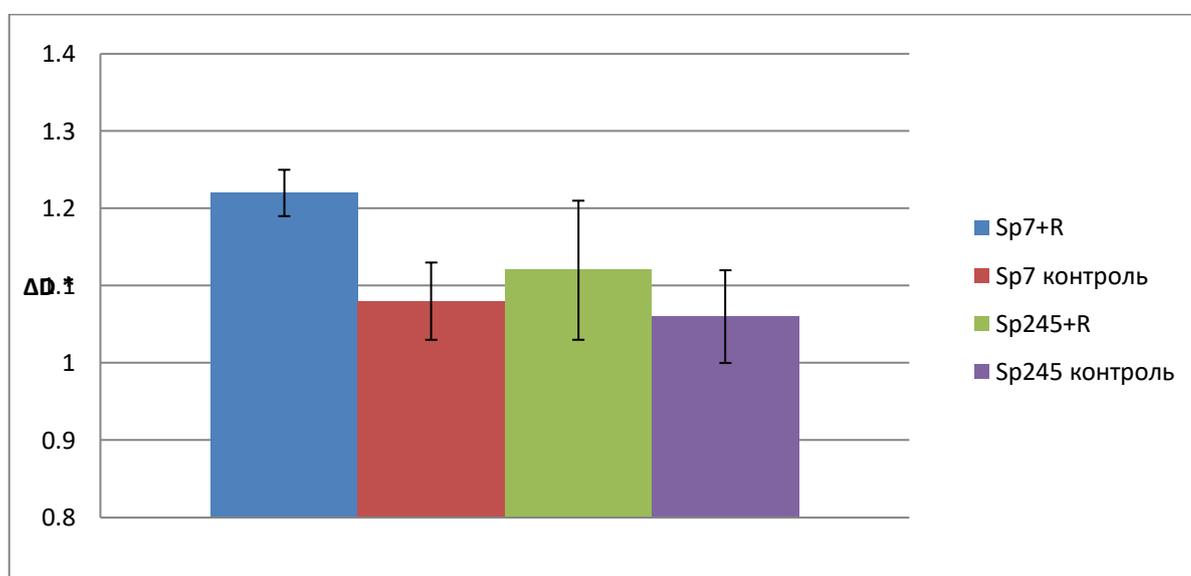
Культивирование микроорганизмов проводилось при постоянном помешивании на виростенде при $t=30^{\circ}\text{C}$.

Начальная плотность посева инокулята составляла $D_{600\text{нм}} = 0,1$.

Для оценки роста отбирали 1 мл культуры, центрифугировали, отмывали однократно раствором NaCl (0,15 М), ресуспендировали в 1 мл NaCl (0,15 М) и измеряли оптическую плотность при длине волны 600 нм. При этом использовали показатель относительного изменения оптической плотности ($\Delta D_{600\text{нм}}$) по сравнению с исходным значением.

При внесении рутина в среду LB/2 наблюдается увеличение показателя ΔD суспензии клеток *A. brasilense* Sp7 по сравнению с контрольным образцом, что говорит о более интенсивном росте культуры в присутствии флавоноида (Рисунок 1).

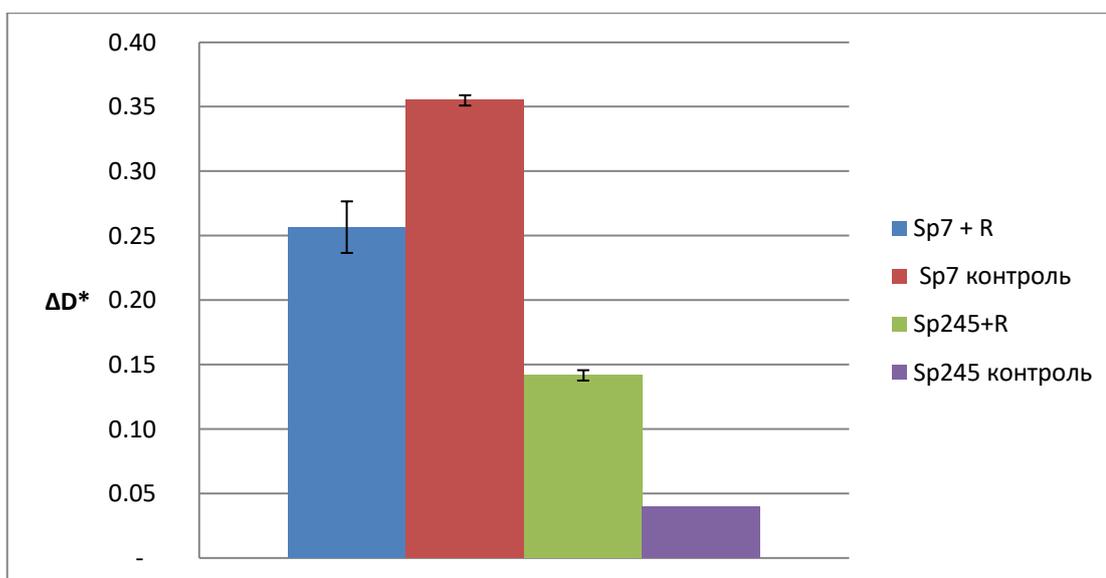
При исследовании роста культуры *A. brasilense* Sp245, выращиваемой в аналогичных условиях, не наблюдалось достоверного снижения значения ΔD суспензии клеток опытного образца по сравнению с контролем, что может свидетельствовать об отсутствии как торможения, так и интенсификации роста культуры (Рисунок 1).



*Примечание: Результаты представлены в виде разницы между значением оптической плотности культуры по истечении срока культивирования и ее начальным значением

Рисунок 1 – Изменение ΔD суспензии клеток *A. brasilense* Sp7 и Sp245 при росте на богатой среде LB/2

При культивировании *A. brasilense* Sp7 на синтетической среде MC-1 с добавлением рутина отмечается снижение ΔD суспензии клеток по сравнению с контрольным образцом (Рисунок 2). В то же время для штамма *A. brasilense* Sp245 наблюдается обратная картина: интенсификация роста культуры в присутствии флавоноида.

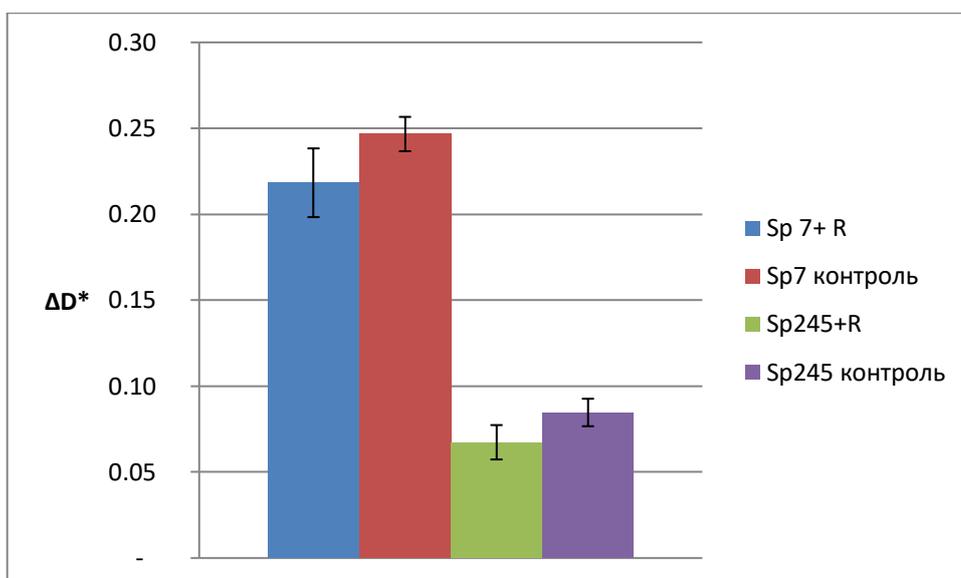


*Примечание: Результаты представлены в виде разницы между значением оптической плотности культуры по истечении срока культивирования и ее начальным значением

Рисунок 2 – Изменение ΔD суспензии клеток *A. brasilense* Sp7 и Sp245 при росте на синтетической среде МС-1

При культивировании *A. brasilense* Sp7 и Sp245 на синтетической среде МС-2 с добавлением рутина отмечается недостоверное снижение роста исследуемой культуры в сравнении с контролем (Рисунок 3).

По всей видимости, торможение роста культуры можно объяснить отсутствием факторов роста в средах МС-1 и МС-2. Также немаловажно отметить, что исследуемые бактерии не могут использовать рутин в качестве источника углерода, о чём свидетельствуют результаты роста культуры на среде МС-2



*Примечание: Результаты представлены в виде разницы между значением оптической плотности культуры по истечении срока культивирования и ее начальным значением

Рисунок 3 – Изменение ΔD суспензии клеток *A. Brasilense* Sp7 и Sp245 при росте на синтетической среде МС-2

Таким образом, установлено, что наиболее интенсивный рост *A. brasilense* Sp7и Sp245 происходит на богатой среде LB. Для остальных сред этот процесс происходит с меньшей интенсивностью.

Исходя из результатов, полученных при культивировании исследуемых микроорганизмов на синтетических средах МС-1 и МС-2 можно сделать вывод, что рутин не используется азосприллами в качестве источника углерода.

Результаты ВЭЖХ показали, в экстракте КЖ *A. brasilense* Sp7 обнаружен продукт, имеющий то же время удержания, что и рутин, но отличающийся от исходного флавоноида спектром поглощения (Рисунок 4). Наблюдаемый эффект может быть связан с незначительными изменениям структуры рутина (раскрытие колец, насыщение кратных связей).

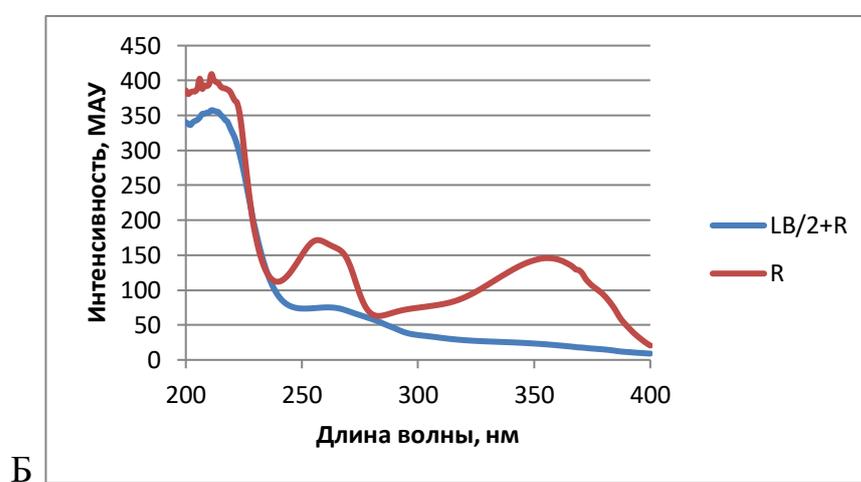
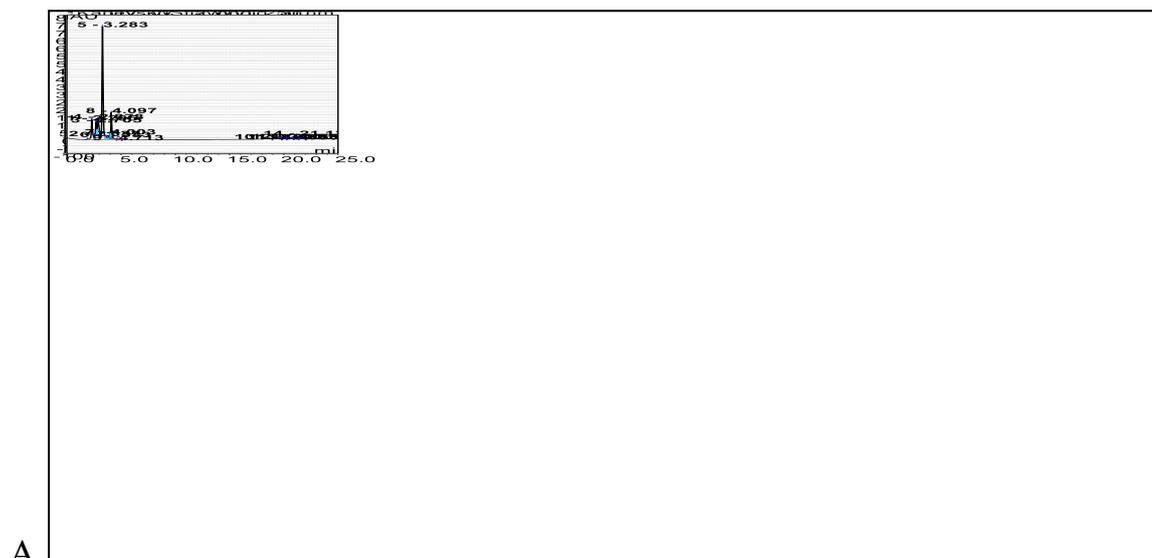
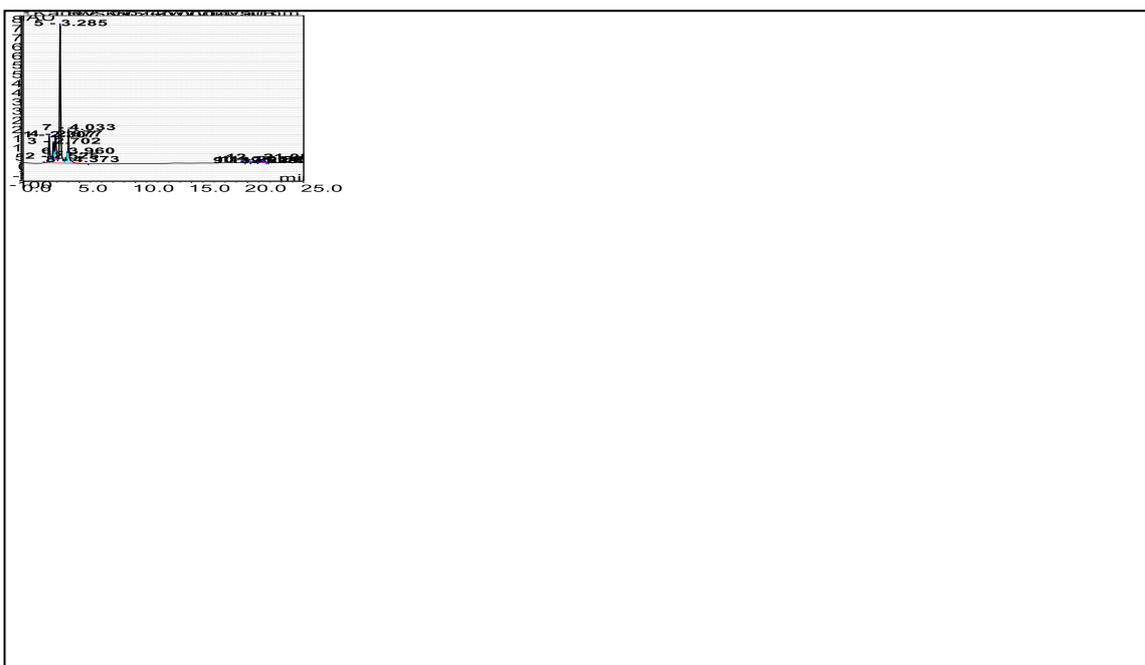


Рисунок 4 – ВЭЖХ (А) и УФ спектры (Б) экстракта КЖ *A. brasilense* Sp7, выращенной на среде LB/2 с добавлением рутина

При исследовании КЖ *A. brasilense* Sp245 также выявлены изменения в структуре молекулы флавоноида (Рисунок 5).

Сравнительный анализ образцов, полученных в ходе роста исследуемых штаммов показал, что модификации рутина обладают сходными свойствами. Из этого можно сделать вывод, что *A. brasilense* Sp7 и Sp 245 не различаются по способности к деградации рутина (Рисунок 6).



A

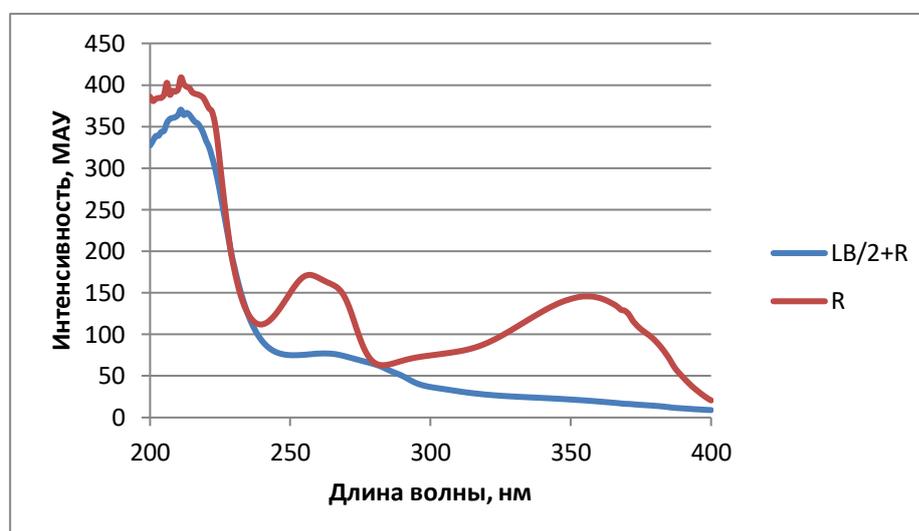


Рисунок 5 – ВЭЖХ (А) и УФ спектры (Б) экстракта КЖ *A. brasilense* Sp245, выращенной на среде LB/2 с добавлением рутина

Анализ экстрактов КЖ исследуемых штаммов, выращенных на синтетических питательных средах МС-1 и МС-2, не выявил наличия модификаций флавоноида. Это обусловлено низкой интенсивностью роста данных культур.

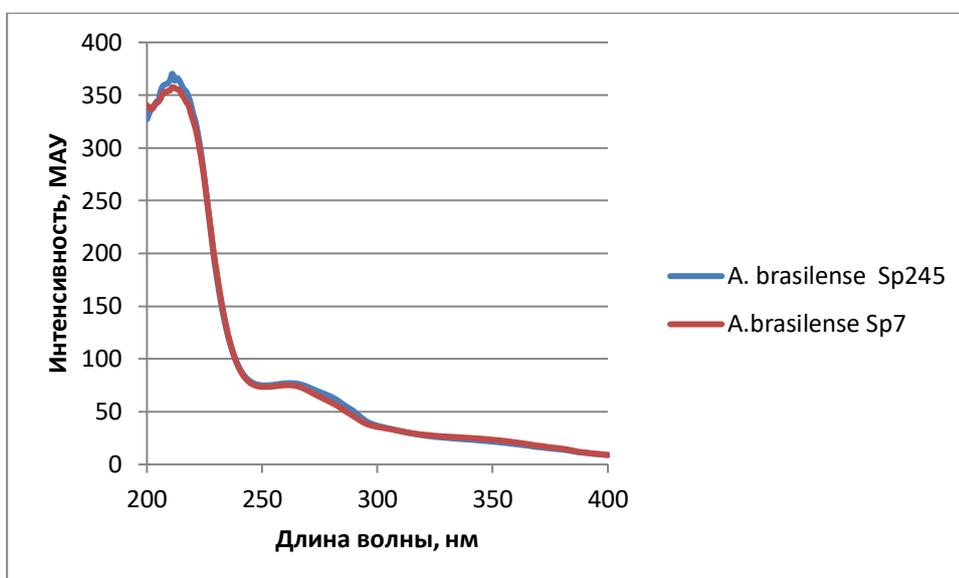


Рисунок 6 – Сравнение экстрактов КЖ *A. brasilense* Sp7 и Sp245, выращенных на среде LB/2 с добавлением рутина

Кверцетин не был обнаружен ни в одном из полученных образцов. Исходя из этого можно сделать предположение об отсутствии у *A. brasilense* Sp7 и *A. brasilense* Sp245 фермента α -L-размозидазы, отвечающего за расщепление гликозидной связи между агликоном и дисахаридом рутинозой.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования по изучению динамики роста бактерий *A. brasilense* Sp7 и Sp245 в присутствии рутина показали, что данный флавоноид не оказывает существенного влияния на интенсивность роста культуры. При внесении рутина в состав питательной среды выявлена интенсификация роста культуры для штамма *A. brasilense* Sp7 (при культивировании на богатой среде LB/2) и *A. brasilense* Sp245 (при культивировании на синтетической среде МС-1). В остальных случаях исследуемые культуры уступают по данному показателю контрольным образцам.

Исходя из результатов, полученных при культивировании *A. brasilense* Sp7 и Sp245 на синтетических средах МС-1 и МС-2 можно сделать вывод, что рутин не используется азосприллами в качестве источника углерода.

Методом ВЭЖХ было установлено, что в ходе роста культуры *A. brasilense* Sp7 и Sp245 на богатой среде LB/2 в присутствии рутина происходит изменение структуры флавоноида. Подобный эффект не наблюдается при культивировании исследуемых штаммов на синтетических средах МС-1 и МС-2.

Сравнительный анализ образцов, полученных в ходе роста *A. brasilense* Sp7 и Sp245 на среде LB/2 в присутствии рутина показал, что исследуемые штаммы не различаются по способности к модификации данного флавоноида.

ВЫВОДЫ

1. Внесение рутина в состав питательной среды не оказывает существенного влияния на интенсивность роста *A. brasilense* Sp7 и Sp245.

2. *A. brasilense* Sp7 и Sp245 не способны использовать рутин в качестве источника углерода.

3. Методом ВЭЖХ было установлено, что в ходе роста культуры *A. brasilense* Sp7 и Sp245 на богатой среде LB/2 в присутствии рутина происходит изменение структуры флавоноида. Подобный эффект не наблюдается при культивировании исследуемых штаммов на синтетических средах МС-1 и МС-2.

4. *A. brasilense* Sp7 и Sp245 не отличаются по способности к деградации рутина.

Коч