

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

Кафедра биохимии и биофизики

**ВЛИЯНИЕ ФЛАВОНОИДОВ НА СОСТАВ ГЛИКОПОЛИМЕРОВ
ПОВЕРХНОСТИ *Azospirillum. brasilense Sp7***

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

студента 4 курса 421 группы

направления подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология

Биологического факультета

Мищенко Сергея Сергеевича

Научный руководитель:

доцент кафедры биохимии

и биофизики, к.б.н.

дата, подпись

М.В. Каневский

Зав. кафедрой биохимии и биофизики,

д.б.н., профессор

дата, подпись

С.А. Коннова

Саратов 2020

ВВЕДЕНИЕ.

В современном мире люди, в угоду времени и быстрому ритму жизни, вынуждены постоянно делать новые открытия, которые позволят в той или иной степени сократить время, затрачиваемое, например, на выращивание нужных растений. Хотя это и не всегда удается, но уже известно, что помочь в этом человеку способны определенные бактерии.

В настоящее время грамотрицательные бактерии являются основным предметом исследования не только для микробиологов, но и для биохимиков, иммунологов и т.д. Такой интерес к данным микроорганизмам обусловлен многими причинами: повсеместным распространением, наличием бактерий, участвующих в симбиозе с различными организмами, а также продукцией биологически активных соединений. В данный момент еще одним важным аспектом исследования грамотрицательных бактерий является изучение зависимости их основных компонентов поверхности от различных факторов окружающей среды (температура, рН и т.д.). Изучение данного вопроса поможет понять, каким образом бактерии контактируют с другими микроорганизмами, и какие факторы могут определять это взаимодействие.

Одним из перспективных объектов для исследования являются почвенные азотофиксирующие бактерии рода *Azospirillum*. Применительно к данным ризобактериям важным является изучение компонентов поверхности, в том числе углеводной природы, и их изменение под воздействием различных факторов, например, в присутствии флавоноидов, как основных сигнальных молекул при формировании ассоциаций с растениями. В первую очередь, это исследование необходимо для установления основных закономерностей симбиотического взаимодействия между азоспириллами и растениями.

Целью исследования является определение влияния флавоноидов в среде культивирования на состав жирных кислот капсульных и мембранных гликанов бактерий *Azospirillum brasilense* Sp7.

В связи с этим были поставлены следующие задачи:

1. Провести культивирование бактерий *A. brasilense* Sp7 в присутствии флавоноидов кверцетина и рутина в течение 1, 3 и 7 суток.
2. Получить препараты гликополимеров поверхности бактерий *A. brasilense* Sp7, выращенных при добавлении кверцетина и рутина в питательную среду.
3. Охарактеризовать состав жирных кислот (ЖК) капсульных и мембранных гликанов *A. brasilense* Sp7, выращенных в присутствии кверцетина и рутина.

В ходе работы были получены образцы контрольные образцы КПС и ЛПС бактерий *A. brasilense* Sp7, которые были предоставлены коллекцией ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН (<http://collection.ibppm.ru/>). И образцы КПС и ЛПС с добавлением раствора кверцетина и рутина в диметилформамиде (ДМФА) так, чтобы их конечная концентрация составляла 125 мкМ (раствор добавлялся непосредственно перед посевом).

Бактерии рода *Azospirillum* формируют ассоциации с ценными хлебными злаками, что позволяет их использовать в составе экологически чистых биопрепаратов для повышения урожайности растений. В составе корневых экссудатов пшеницы, ржи, кукурузы и других сельскохозяйственно значимых макропартнеров азоспирилл присутствуют различные флавоноиды, например, кверцетин. Данный флавоноид является одним из самых распространенных вторичных метаболитов растений и, в то же время, исходным веществом для биосинтеза других представителей флавоноидов. Помимо кверцетина в работе также применялся широко встречающийся в почве флавоноид рутин, который обладает большей гидрофильностью за счёт присутствия в составе углеводной компоненты – дисахарида рутинозы.

Бакалаврская работа состоит из введения, трех глав (обзор литературы, материалы и методы, результаты исследований и их обсуждение), заключения, выводов, списка использованных источников, включающего пятьдесят семь источников на русском и английском языках.

Основное содержание работы.

Культивирование бактерий *A. brasilense* Sp7 осуществляли в колбах Эрленмейера в течение 24, 72 и 168 ч при встряхивании на термостатированной качалке (частота вращения 120 об/мин, при температуре 30°C) в жидкой среде LB следующего состава (г/л): триптон – 10.0, дрожжевой экстракт – 5.0, NaCl – 5.0 [49]. Питательные среды стерилизовали путем автоклавирования в течение 30 мин при температуре 121°C. Для исследования влияния флавоноидов на состав гликополимеров поверхности бактерий типового штамма непосредственно перед посевом в среду добавляли растворы кверцетина и рутина в диметилформамиде (ДМФА) так, чтобы их конечная концентрация составляла 125 мкМ.

Для отмывания капсульного материала с поверхности бактериальных клеток биомассу суспендировали в 0.15М растворе NaCl, перемешивали на магнитной мешалке на протяжении 24 ч и центрифугировали в течение 20 мин при $16000 \times g$. Процедуру смыва капсулы с клеток повторяли на протяжении 6 сут. с ежедневной заменой отмывающего раствора. Объединенные супернатанты, полученные в ходе первых двух суток отмывания, концентрировали, диализовали против дистиллированной воды (48 ч) и лиофилизировали.

Бактериальные клетки, отмые от капсулы, высушивали ацетоном, затем гомогенизировали биомассу растиранием в ступке и использовали для экстракции ЛПС по модифицированной методике Вестфала.

В термостойкую колбу к разогретому до 68°C 45%-ному фенолу добавляли диспергированную биомассу и выдерживали при температуре 68-70°C при постоянном перемешивании на магнитной мешалке в течение 40 минут. Затем смесь охлаждали и диализовали против проточной воды на протяжении 72 ч.

После диализа полученный экстракт концентрировали и освобождали от нуклеиновых кислот и белков подкислением экстракта до pH 2.5-2.7 40%-ной трихлоруксусной кислотой. Образовавшийся осадок отделяли

центрифугированием, а супернатант, содержащий ЛПС, диализовали против дистиллированной воды в течение 48 ч, затем экстракт концентрировали и лиофильно высушивали.

Состав и соотношение ЖК в исследуемых препаратах анализировали методом газожидкостной хроматографии (ГЖХ), предварительно проводя метилирование образцов в соответствии с работой. Идентификацию метиловых эфиров жирных кислот (МЭЖК) осуществляли по эталонным образцам фирмы Sigma-Aldrich (США). Относительное количественное содержание ЖК определяли по доле соответствующих МЭЖК и выражали в процентах к сумме всех идентифицированных пиков на основании соотношения их площадей. Параметры проведения ГЖХ: градиент температуры – от 130°C до 270°C со скоростью нагрева 4°C/мин.

Бактерии рода *Azospirillum* формируют ассоциации с ценными хлебными злаками, что позволяет их использовать в составе экологически чистых биопрепаратов для повышения урожайности растений. В составе корневых экссудатов пшеницы, ржи, кукурузы и других сельскохозяйственно значимых макропартнеров азоспирилл присутствуют различные флавоноиды, например, кверцетин [52]. Данный флавоноид является одним из самых распространенных вторичных метаболитов растений и, в то же время, исходным веществом для биосинтеза других представителей флавоноидов. Помимо кверцетина в работе также применялся широко встречающийся в почве флавоноид рутин, который обладает большей гидрофильностью за счёт присутствия в составе углеводной компоненты – дисахарида рутинозы.

Нами было проведено культивирование типового штамма бактерий *A. brasilense* Sp7 в присутствии флавоноидов кверцетина и рутина в питательной среде на протяжении 24, 72 и 168 ч. Известно, что при периодическом культивировании бактерии *A. brasilense* к 18-22 ч роста достигают окончания экспоненциальной фазы, а 72- и 168-часовые культуры находятся на разных этапах стационарной фазы роста. Как было показано ранее, выращивание азоспирилл при добавлении флавоновых веществ в

среду не сопровождалось изменениями в динамике роста. В связи с этим полученным нами культуры типового штамма, рост которых осуществлялся как в стандартных условиях, так и в присутствии кверцетина и рутина, находились на одинаковых фазах роста. Микроскопия 168-часовых культур *A. brasilense* Sp7 показала наличие в пробах жизнеспособных подвижных клеток, что в совокупности со стабильными значениями их оптической плотности свидетельствовало о том, что бактерии еще не перешли в фазу отмирания.

С поверхности клеток 24-, 72- и 168-часовых культур *A. brasilense* Sp7, выращенных в стандартных и экспериментальных условиях, были получены образцы КПС, а из внешних мембран данных бактерий были выделены образцы ЛПС. Выходы КПС и ЛПС, выраженные в процентах от высушенной биомассы клеток, представлены в таблице 1. Так, следует отметить, что продукция КПС бактериями типового штамма возрастала при росте в присутствии кверцетина в течение 24 ч приблизительно в два раза по сравнению со стандартной культурой на аналогичной фазе роста. В случае 72-часовых культур наблюдался обратный эффект: снижение выходов КПС в среднем в два раза для азоспирилл, выращенных с кверцетином. Увеличение продукции КПС для 168-часовых бактерий наблюдалось при добавлении рутина в питательную среду. Существенных изменений в выходах ЛПС штамма Sp7 при использовании различных флавоноидов не обнаружено.

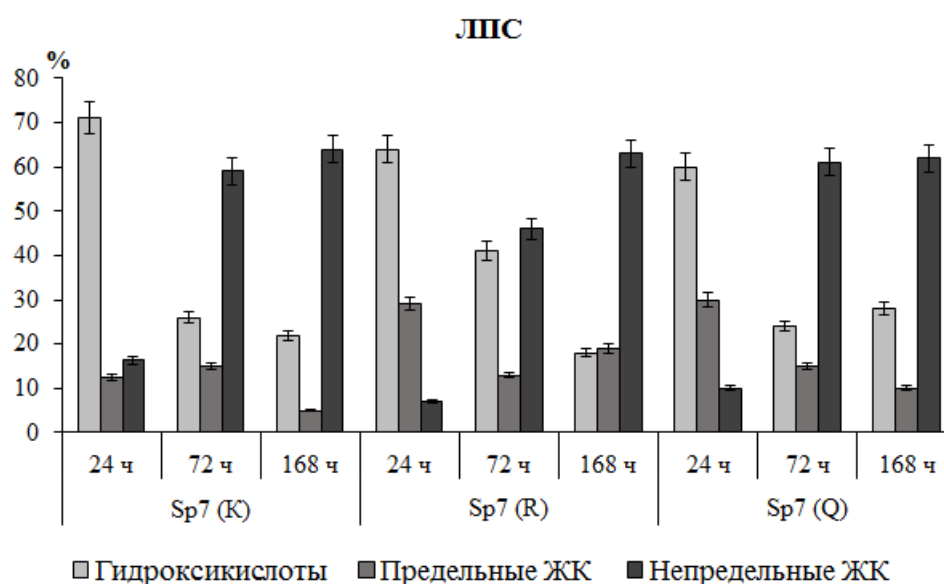
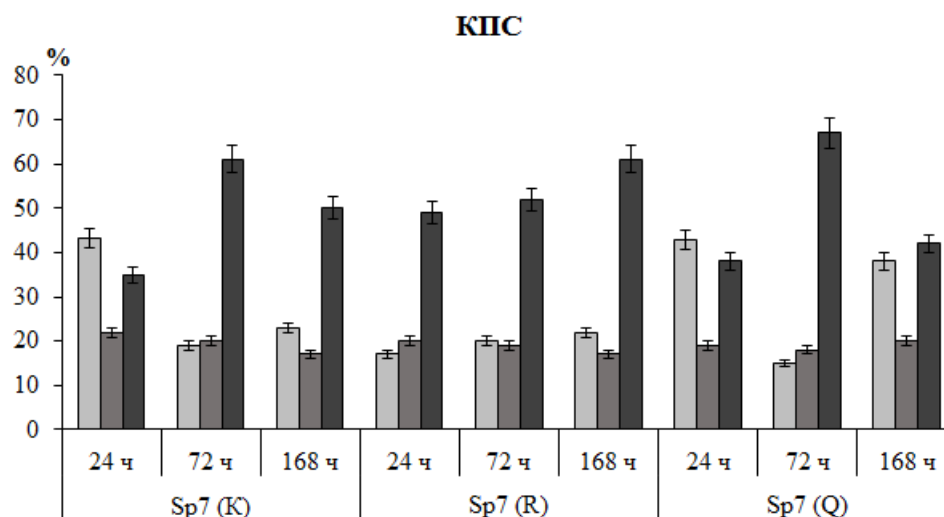
ЖК, составляющие основу липида А, определяют гидрофобность молекул ЛПС и КПС. Биологическая активность данных гликополимеров находится в прямой зависимости от качественного и количественного состава ЖК. Длина цепей, а также природа ацильных компонентов оказывают существенное влияние на упорядоченность и компактность липида А, и, как следствие, на стабильность наружной мембраны бактерий, её проницаемость и текучесть.

Таблица 1 – Выходы КПС и ЛПС бактерий *A. brasilense* Sp7, выращенных в стандартных условиях (К) и в присутствии рутина (R) и кверцетина (Q)

Вариант	Масса, г	ЛПС, мг	Выход ЛПС, %	КПС, мг	Выход КПС, %
<i>A. brasilense</i> Sp7 (К)					
24 ч	6.1	601.1	10.0	226.2	3.7
72 ч	4.0	257.1	6.4	275.4	7.0
168 ч	3.5	299.3	8.6	114.4	3.3
<i>A. brasilense</i> Sp7 (R)					
24 ч	7.8	451.9	9.0*	274.7	3.5
72 ч	5.0	300.0	6.0	526.0	10.5
168 ч	1.1	79.4	7.2	74.7	6.8
<i>A. brasilense</i> Sp7 (Q)					
24 ч	2.8	286.5	10.2	234.4	8.4
72 ч	10.6	361.4	7.2*	381.1	3.6
168 ч	7.2	215.0	5.7**	168.3	2.3

Примечание: экстракция ЛПС проводилась из 5 (*) и 3.8 (**) г высушенных клеток.

Нами был проведен анализ жирнокислотного состава выделенных образцов КПС и ЛПС методом ГЖХ (Рисунок 4). В составе исследуемых препаратов были выявлены МЭЖК с длиной углеродной цепи от C14 до C19. Состав ЖК КПС и ЛПС бактерий типового штамма при культивировании в стандартных условиях изменялся при увеличении длительности роста. Так, к середине стационарной фазой роста в составе как КПС, так и ЛПС преобладали непредельные ЖК, большая часть которых приходилась на октадеценовые кислоты C18:1. Аналогичная тенденция сохранялась при переходе азоспирилл на позднюю стационарную фазу роста в данных условиях. Добавление в среду культивирования азоспирилл флавоноида рутина приводило к превалированию непредельных ЖК в случае КПС к первым суткам выращивания, однако дальнейшее увеличение продолжительности роста не сопровождалось существенными изменениями



Доверительные интервалы приведены для 95%-ого уровня значимости
 Рисунок 4 – Состав ЖК препаратов КПС и ЛПС бактерий *A. brasilense* Sp7, культивируемых в стандартных условиях (К) и в присутствии рутина (R) и кверцетина (Q) (в % от общей суммы площадей пиков МЭЖК)

состава ЖК. В липидах А ЛПС штамма Sp7 по мере роста в присутствии рутина наблюдалось постепенное перераспределение соотношения ЖК: к 24 ч в ЛПС доминировали 3-гидроксилированные ЖК, к 72 ч содержание гидроксикислот и непредельных ЖК было приблизительно одинаково, а к 168 ч – резко возросла доля непредельных кислот. Выращивание бактерий типового штамма в среде с кверцетином так же индуцировало изменения

жирнокислотном составе КПС и ЛПС. В КПС к 72 ч культивирования увеличивалось содержание непредельных ЖК в полтора раза, однако к 168 ч состав и соотношение ЖК соответствовало таковым для суточных культур. В случае ЛПС, пятикратное возрастание доли непредельных ЖК в середине стационарной фазы роста сохранялось и при переходе на более позднюю стадию данной фазы.

Заключение. Ассоциативные бактерии, как показал анализ научной литературы, являются одним из самых широко используемых объектов исследований для биохимиков и микробиологов. Такой интерес к данным микроорганизмам обусловлен не только их способностью вступать в симбиотические взаимоотношения с растениями, но и особенностями их клеточного метаболизма, которые позволяют им адекватно реагировать на изменения факторов окружающей среды или условия культивирования. Что касается изучения поверхностных гликополимеров бактерий рода *Azospirillum*, в частности КПС и ЛПС, при воздействии флавоноидов растительной природы, то оно может послужить новым этапом развития представлений о стратегиях взаимодействия азоспирилл с дикорастущими и культурными растениями.

Выявленные нами тенденции изменения соотношения ЖК в препаратах КПС и ЛПС бактерий *A. brasilense* Sp7 при добавлении в среду культивирования флавоноидов рутин и кверцетин указывают на важную функцию данных гликанов в реализации ключевых этапов формирования растительно-микробных ассоциаций.

ВЫВОДЫ

1. При добавление в среду культивирования кверцетин и рутин наблюдается изменение продукции КПС и ЛПС. Это свидетельствует о том, что флавоноиды влияют на состав капсульной и мембранной поверхности бактерий. Но существуют отличия в продукции КПС и ЛПС, зависящей от того, какой флавоноид добавляли в питательную среду.

2. При добавлении в питательную среду происходит изменение состава жирных кислот КПС и ЛПС. В зависимости от того, какой флавоноид добавляли в питательную среду, происходили соответствующие колебания в преобладании гидрокислот, непредельных и предельных ЖК.