

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 НЕКОТОРЫЕ ФИЗИКО-
ХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КЛЕТОК
AZOSPIRILLUM BRASILENSE SP245**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 2 курса 241 группы

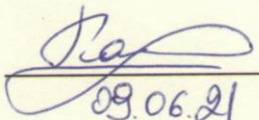
Направления подготовки 06.04.01 Общая биология

Биологического факультета

Кошелевой Ирины Сергеевны

Научный руководитель:

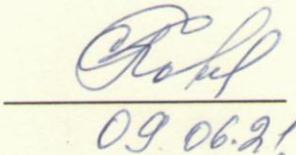
доцент, канд. биол. наук


09.06.21

М.В. Каневский

Зав. кафедрой:

профессор, док.биол. наук


09.06.21

С.А. Коннова

Саратов 2021

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 штамм *A. brasilense* Sp245.

Рутин и кверцетин – флавоноиды, относящийся к классу флавонолов. Нарингенин – флавоноиды, по современной классификации причисляемый к флавононам. Выбор данных соединений в качестве объекта исследования обусловлен их широкой распространенностью в природе и в растительных экссудатах.

Цель работы – исследование влияния разных концентраций кверцетина, рутина и нарингенина на физико-химические и антигенные свойства поверхности клеток *Azospirillum brasilense* Sp245.

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

1. Выяснить влияние исследуемых флавоноидов на электрооптические параметры клеточной суспензии *A. brasilense* Sp245

2. Исследовать изменение антигенных свойств поверхности *A. brasilense* Sp245.

3. Оценить изменение продукции бактериями экстраклеточных полисахаридов (ЭПС).

4. Определить убыль флавоноидов в культуральной жидкости после роста культуры.

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. Измерение электрооптического сигнала проводилось на электрооптическом анализаторе ELUS. Анализ полученных образцов проводился на комплексе для высокоэффективной жидкостной хроматографии с УФ- детектированием.

Структура магистерской работы. Работа состоит из введения, основной части, заключения, выводов, списка использованных источников. Литературный обзор составлен на основе анализа 82 источников и включает в себя следующие вопросы: общие сведения о флавоноидах (структура и классификация, биосинтез и пути катаболизма, выполняемые функции, характеристика бактерий рода *Azospirillum*, роль бактериальных гликополимеров в формировании растительно-бактериальных ассоциаций).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

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

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

Культивирование микроорганизмов проводилось на синтетической малатно-солевой среде, 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.

Среду стерилизовали 30 минут при 121°C.

Кверцетин, нарингенин и 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 $D_{600\text{нм}} = 0,1$.

Оценка антибактериальной активности исследуемых флавоноидов осуществлялась посредством подсчета колониеобразующих единиц (КОЕ). Рост бактерий в присутствии рутина был выше, чем у контрольного образца. Нарингенин также не приводил к снижению показателя КОЕ. Под влиянием кверцетина количество КОЕ снижалось на 60 и 80% (концентрации 50 и 100 мкМ соответственно). Кверцетин в концентрации 200 мкМ выпадал в осадок хлопьями, в связи с этим его биодоступность в растворе резко снижалась. Как следствие, влияние на рост культуры обнаружено не было. Полученные результаты интересны тем, что бактерии по-разному реагируют на разные флавоноиды.

Мы предположили, что внесение дополнительного агента в состав среды приведёт к изменению физико-химических свойств поверхности клеток, что отразится на величине электрооптического сигнала. Далее нами была произведена оценка изменения электрооптических свойств суспензии клеток *A.brasilense* Sp245, выращенных в присутствии кверцетина, рутина и нарингенина (опытные образцы) и без добавление флавоноидов (контроль). Исследуемые флавоноиды добавляли в среду для достижения конечной концентрации 50, 100 и 200 мкМ. Выращивание клеток проводилось в течение

1 суток, эксперимент включал в себя три биологические и три аналитические повторности.

Присутствие в среде выращивания кверцетина в указанных концентрациях снижало показатель электрооптического сигнала во всём диапазоне частот на 75 % по сравнению с контролем (рисунок 1 А). Наличие рутина в среде культивирования приводило к увеличению значения электрооптического сигнала в низкочастотной области (рисунок 1 Б). В высокочастотном диапазоне, напротив, наблюдается увеличение интенсивности электрооптического сигнала. Наибольшее отличие (до 50 %) наблюдались при концентрации рутина 200 мкМ. Также отмечена корреляция между увеличением содержания данного флавоноида в среде и возрастанием интенсивности электрооптического сигнала относительно контроля.

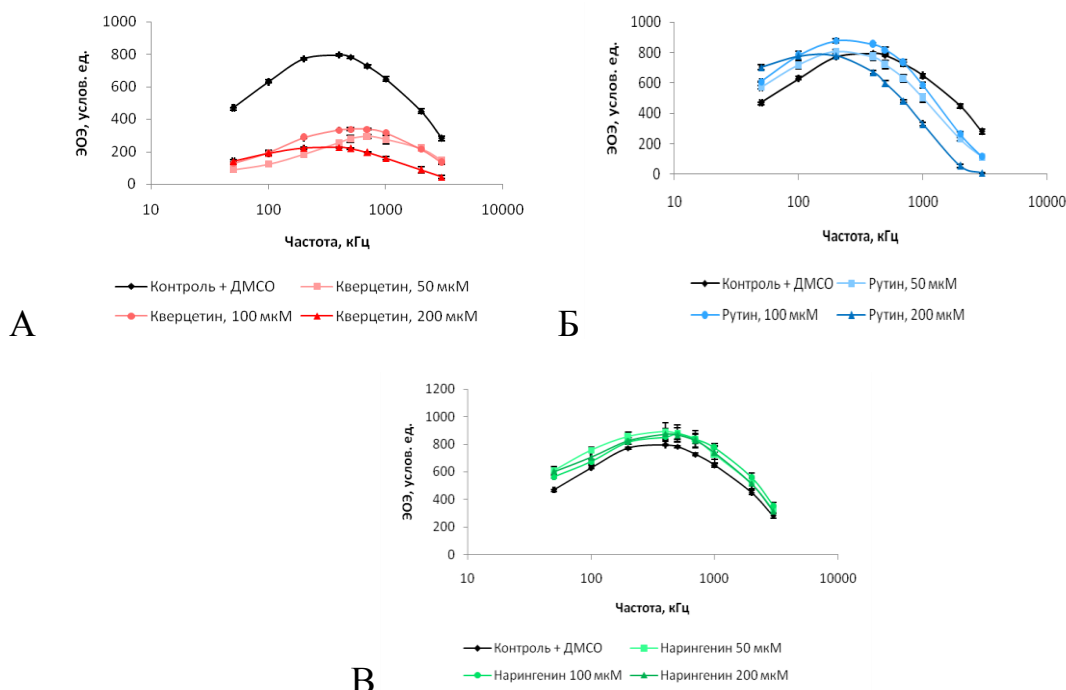


Рисунок 10 – Изменение электрооптического сигнала суспензии клеток *A. brasilense* Sp 245, выращенных в присутствии кверцетина (А), нарингенина (Б) и рутина (В)

Полученные данные свидетельствует об изменении величины заряда поверхности клеток, что может быть обусловлено изменениями состава и структуры представленных на поверхности полимеров.

Добавление нарингенина в среду приводило к незначительному увеличению значения электрооптического сигнала во всём диапазоне частот относительно контроля (рисунок 1 В), что также может быть следствием изменений, произошедших с экспонированными во внешнее пространство полимерами.

Для оценки изменения в составе и структуре гликополимеров поверхности бактериальных клеток применялись антитела, полученные на клетки *A. brasilense* Sp 245, обработанные глутаровым альдегидом. Во всех вариантах эксперимента методом электрооптического анализа было установлено специфическое взаимодействие антител с клетками, выращенными в присутствии кверцетина, нарингенина, и рутина, что свидетельствует об отсутствии изменений в составе и структуре липополисахаридов.

Было проведено исследование влияния флавоноидов на способность *A. brasilense* Sp245 к формированию биоплёнок. Результаты эксперимента представлены на рисунке 2.

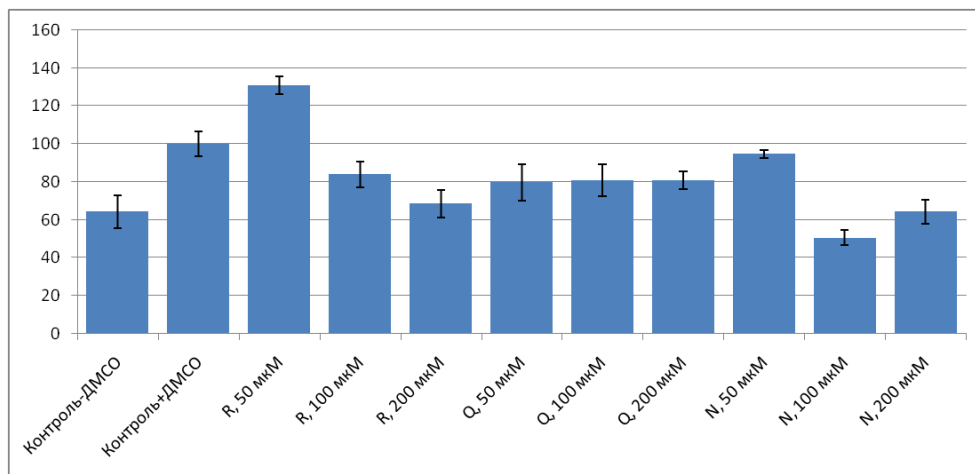


Рисунок 2– Влияние флавоноидов на биомассу биоплёнок *A. brasilense* Sp245, сформированных на пластиковом планшете (R – рутин, Q - кверцетин, N - нарингенин)

Наибольший прирост биомассы биоплёнки демонстрирует образец, культивируемый при концентрации рутина 50 мкМ. Это может быть связано с тем, что гликозиды флавоноидов не только обладают меньшей по сравнению с

агликонами бактериостатической, но и стимулирующей рост бактерий активностью. В остальных случаях наблюдается снижение биомассы биоплёнок, вызванное, вероятно, тем что агликоновые формы флавоноидов обладают большим бактериостатическим эффектом.

Известно, что количество ЭПС, образуемых бактериями, может варьироваться в зависимости от условий культивирования. Для оценки активности синтеза ЭПС бактериями *A.brasilense* Sp245 при различных концентрациях исследуемых флавоноидов было подсчитано соотношение произведенных внеклеточных углеводсодержащих полимеров к сухой биомассе клеток. Для этого бактерии осаждали из культуральной жидкости центрифугированием, клеточная биомасса высушивалась до постоянного веса. Культуральную жидкость кипятили для останковки энзиматических реакций, после чего проводили анализ содержания углеводов методом Дюбуа. Результаты относительного содержания углеводов в культуральной жидкости представлено на рисунке 3.

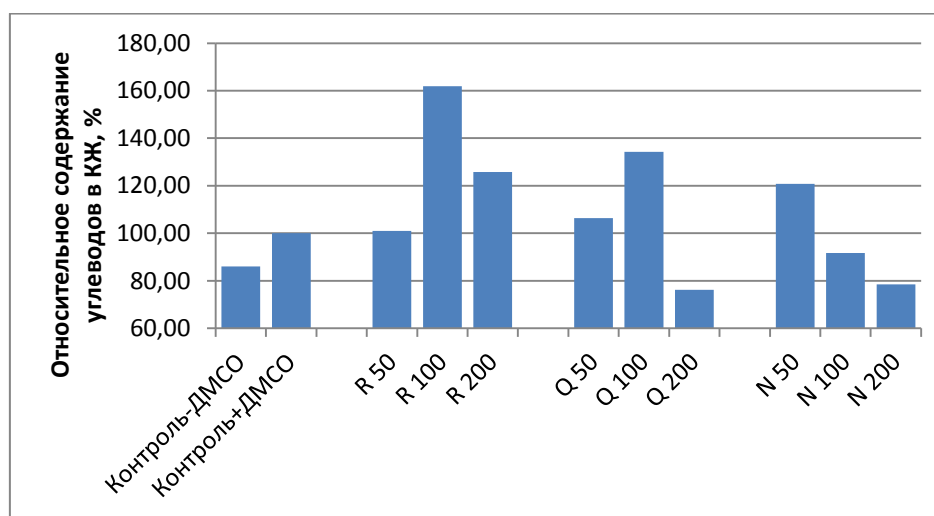


Рисунок 3 – Относительное содержание углеводов в КЖА. *brasilense* Sp245 в присутствии различных концентраций рутина (R), кверцетина (Q) и нарингенина (N) после 20 часов роста

Максимальное возрастание количества углеводов в КЖ (на 60%) обнаружено в опыте с концентрацией рутина 100 мкМ. Культивирование *A. brasilense* Sp245 в присутствии рутина (200 мкМ), кверцетина (100 мкМ) и

нарингенина (50 мкМ) также привело к увеличению продукции экзополисахаридов, однако прирост не превышал 40%.

Поскольку кверцетин ингибирует рост бактериальной культуры, а на разных сроках роста количество и состав ЭПС может отличаться, нами было принято решение дорастить культуру до стадии, соответствующей контролю. В связи с этим было принято решение увеличить срок роста культуры до 48 часов, поскольку анализ КОЕ показал, что в присутствии кверцетина культура достигает значений контроля через данный промежуток времени. Было показано, что увеличение срока роста не приводит к изменениям в продукции ЭПС бактериями.

Далее для образцов, показавших наибольший выход гликополимеров (рутин в концентрациях 100 и 200 мкМ, кверцетин 100 мкМ и нарингенин 50 мкМ) было проведено выделение ЭПС из КЖ бактерий. Эксперимент показал, что культивирование *A. brasilense* Sp 245 в присутствии рутина (100, 200 мкМ) приводит к увеличению продукции бактериями обеих фракций ЭПС – осадка и надосадка (рисунок 4). Применение кверцетина в концентрации 100 мкМ приводит к возрастанию количества осадка ЭПС, но, не надосадочной фракции ЭПС. И для рутина, и для кверцетина в указанных концентрациях характерно ингибирование синтеза капсульных полисахаридов. Нарингенин в концентрации 50 мкМ подавляет выработку обеих фракций экзополисахаридов и не оказывает влияния на синтез КПС.

Для количественного определения содержания флавоноидов в среде после роста культуры было проведено приготовление стандартов кверцетина, рутина и нарингенина с их последующим анализом методом ВЭЖХ, а построение калибровочного графика. Далее культуральную жидкость, полученную в ходе роста опытных образцов, освобождали от клеток центрифугированием, супернатант также анализировали с помощью ВЭЖХ. Сопоставление времени удержания пиков образцов на хроматограмме с временем удержания стандарта позволяло обнаружить в них искомые вещества.

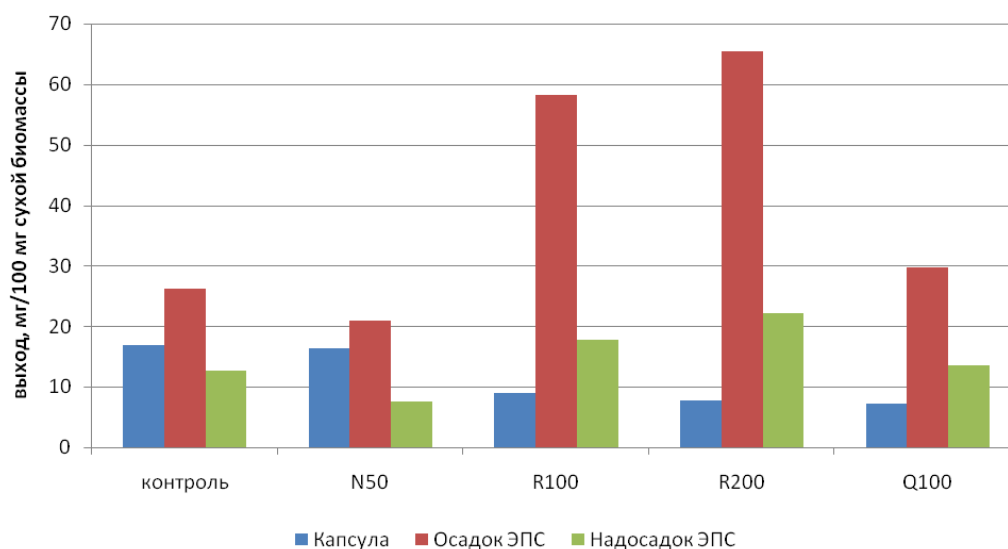


Рисунок 4 – Выход сухой биомассы гликополимеров *A. brasilense* Sp 245 культивировании в присутствии флавоноидов (N50 – нарингенин 50 мкМ, R100 – рутин 100 мкМ, R200 – рутин 200 мкМ, Q100 – кверцетин 100 мкМ)

Расчет концентрации флавоноидов в экстрактах осуществлялся по высоте пиков стандартов. Полученные результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Количества флавоноидов в культуральной жидкости в ходе роста *A. brasilense* Sp 245

Исходная концентрация, мкМ	Остаток (% от исходной концентрации)		
	Рутин	Нарингенин	Кверцетин
50	100	83	11
100	100	91	2
200	100	92	5

Из полученных данных следует, что содержание рутина в среде культивирования не изменяется в ходе роста бактериальной культуры. Это говорит о том, что *A. brasilense* Sp 245 не использует рутин в качестве источника углерода и не обладает способностью к его модификации и деградации.

Количество нарингенина в среде после роста культуры изменяется незначительно (снижение не превышает 20%), кверцетин, в свою очередь, практически не обнаруживается в среде выращивания. Причиной этому могут служить физико-химические свойства данных соединений. Известно, что агликоны флавоноидов гидрофобны, вследствие чего они легко сорбируются на клеточной мембране. Так как гидрофобность кверцетина выше, чем у нарингенина, он будет интенсивнее сорбироваться на бактериальных клетках, из-за этого его содержание в среде будет ниже.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования по изучению динамики роста бактерий *A. brasiliense* Sp245 в присутствии кверцетина, нарингенина и рутина показали, что интенсивность роста бактерий в присутствии рутина была выше в сравнении с контролем. Нарингенин также не ингибировал рост культуры. В свою очередь, под влиянием кверцетина количество КОЕ снижалось, либо оставалось неизменным.

Эксперименты по изучению влияния кверцетина, нарингенина и рутина на электрооптические параметры клеточной суспензии *A. brasiliense* Sp245 показали, что внесение исследуемых рутина и кверцетина в состав питательной среды приводит к изменению интенсивности электрооптического сигнала, что указывает на изменения физико-химических свойств поверхности клеток азоспирилл. Дальнейшая оценка изменения состава и структуры гликополимеров поверхности проводилась с применением антител. Методом электрооптического анализа было установлено образование специфического комплекса антител с клетками, выращенными в присутствии кверцетина, нарингенина и рутина что свидетельствует о том, что зафиксированные ранее изменения не связаны с модификациями в составе и структуре липополисахаридов.

Способность бактерий рода *Azospirillum* к продукции высокомолекулярных полисахаридов вызывает особый интерес ввиду их вовлеченности в ряд процессов, обеспечивающих успешное формирование

растительно-бактериальных ассоциаций. Установлено, что исследуемые флавоноиды (за исключением рутина в концентрации 50 мкМ) не оказывают существенного влияния на формирование биоплёнок. Однако в присутствии рутина (100, 200 мкМ), кверцетина (100 мкМ) и нарингенина (50 мкМ) отмечается увеличение продукции гликополимеров поверхности штаммом *A. brasilense* Sp245. Более детальный анализ показал, что рутин и кверцетин индуцируют синтез экстраклеточных полисахаридов, но не оказывают влияния на продукцию КПС. Нарингенин, в свою очередь, подавляет выработку обеих фракций ЭПС и не влияет на синтез капсульных полисахаридов.

Количественная оценка содержания рутина, нарингенина и кверцетина в среде после роста культуры показала, что в ходе культивирования не происходит их модификация. Количество рутина в ходе выращивания исследуемого штамма не изменяется, для кверцетина и нарингенина обнаружено снижение содержания в среде, связанное с особенностями физико-химических свойств данных флавоноидов.

Полученные результаты позволяют сделать предположение о специфичности действия флавоноидов в отношении штамма *A. brasilense* Sp 245.

ВЫВОДЫ

1 Наличие рутина в составе питательной среды приводит к увеличению показателя КОЕ по отношению к контрольному образцу, что свидетельствует о более интенсивном росте культуры в присутствии флавоноида. Внесение нарингенина в среду не приводило к снижению показателя КОЕ. Кверцетин в концентрациях 50 и 100 мкМ снижает показатель КОЕ на 60 и 80% соответственно.

2 Методом электрооптического анализа установлено, что под влиянием рутина и кверцетина происходят изменения физико-химических свойств поверхности клеток.

3 Для антител, полученных к обработанным глутаровым альдегидом клеткам *A. brasilense* Sp245 выявлено специфическое взаимодействие с

клетками, выращенными в опытных условиях, что свидетельствует об отсутствии изменения антигенных свойств поверхности бактерий.

4 Рутин в концентрации 50 мкМ индуцирует увеличение биомассы биоплёнок, в то время как остальные флавоноиды не оказывают влияния на этот показатель.

5 Наличие флавоноидов в составе питательной среды влияет на интенсивность накопления экстраклеточных полисахаридов в культуральной жидкости *A. brasilense* Sp 245. Культивирование *A. brasilense* Sp245 в присутствии рутина (концентрация 100 мкМ, 200 мкМ), кверцетина (100 мкМ) и нарингенина (50 мкМ) привело к увеличению продукции экзополисахаридов на 62, 25, 34, 20% соответственно. Присутствие в среде нарингенина в концентрациях 100 и 200 мкМ приводило к снижению продукции ЭПС.

Жом