

Министерство образования и науки Российской Федерации

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра биохимии и биофизики

МОДИФИКАЦИЯ КВЕРЦЕТИНА В ДИНАМИКЕ РОСТА

AZOSPIRILLUM BRASILENSE

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 421 группы

Направление подготовки 06. 03. 01. «Биология»


Биологического факультета

Дымо Алины Михайловны

Научный руководитель:

Ассистент кафедры биохимии

и биофизики, к.б.н.


8.06.18

М. В. Каневский

Зав. кафедрой биохимии и

биофизики, д.б.н.


08.06.2018.

С. А. Коннова

Саратов, 2018

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Бактерии и растения тесно связаны между собой. С одной стороны, они могут создавать различные ассоциации и симбиозы, тем самым помогая друг другу выжить в различных и не всегда благоприятных условиях среды, а с другой стороны, патогенные микроорганизмы могут вредить растениям, проникая в них и разрушая их ткани, даже, вызывая гибель самого растения. В процессе жизнедеятельности растения выделяют множество биологически-активных соединений: органические кислоты, в том числе и аминокислоты, моно- и полисахариды, а также вторичные метаболиты, которые играют важную роль в растительно-микробных взаимодействиях. Одними из наиболее важных и вызывающие интерес соединений, со стороны ученых, являются флавоноиды - вещества фенольной природы.

Флавоноиды содержатся в овощах, фруктах, цветах, семенах, стеблях и корнях растений, которые служат источником их поступления в организм животных и человека.

Одна из важнейших функций флавоноидов — участие в окислительно-восстановительных процессах. Флавоноиды хорошо связывают ионы металлов и образуют с ними комплексы. Поскольку многие металлы, прежде всего металлы переменной валентности, например ионы железа и меди, являются инициаторами перекисного окисления и способствуют образованию свободных радикалов, связывание ионов этих металлов является важным вкладом флавоноидов в защиту организма от окислительного стресса.

Новые данные позволяют предположить, что флавоноиды могут участвовать в процессах экспрессии генов, отвечающих за образование клубеньков, изменять активность регуляторных белков (факторы транскрипции) и участвовать в регуляции клеточного деления.

Нельзя не отметить огромную роль флавоноидов в симбиозе растений и микроорганизмов. Флавоноиды являются хемоаттрактантами и усиливают таксис бактерий к растениям. Флавоноиды узнаются специальным белком (NodD-фактор), содержащимся в бактериальной стенке. Особый интерес вызывает тот факт, что NodD-белок каждого конкретного вида ризобия вызывает активацию ризобияльных генов только со специфическими флавоноидами. Наиболее изучен такой симбиоз между бобовыми растениями и бактериями, относящимися к семейству Rhizobiaceae. В результате данного симбиоза на корнях бобовых растений образуются клубеньки, где ризобии фиксируют азот, переводя его в доступную форму для растений. Флавоноиды регулируют важные процессы в симбиозе: активизацию и размножение микроорганизмов в ризосфере, повышает способность ризобий к клубенокообразованию.

Помимо изучения функций и роли флавоноидов в симбиозе между растениями и бактериями, до сих пор не изученным остается механизм модификации флавоноидов самими бактериями. В частности о роли ассоциативных симбиотических бактерий рода *Azospirillum* в миграции флавоноидов, присутствуют лишь единичные данные.

Исходя из этого, целью данной работы является выявление способности *Azospirillum brasilense* Sp7 к модификации кверцетина.

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

1. Оценить динамику роста *A. brasilense* Sp7 в присутствии кверцетина на синтетической малатно-солевой среде.

2. Оценить динамику роста *A. brasilense* Sp7 в присутствии кверцетина на богатой среде LB и сравнить результаты динамики роста бактерий на средах MC и LB.

3. Методами ТСХ и ВЭЖХ выявить изменения состава экстрактов фенольных соединений из культуральной жидкости *A. brasilense* Sp7 в ходе роста.

Структура бакалаврской работы. Выпускная квалификационная работа состоит из пяти частей: введения, основной части, заключения, выводов и списка использованных источников. Основная часть включает в себя три раздела: обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследований. Раздел обзор литературы состоит из пяти подразделов: общие сведения о флавоноидах; структура, классификация, пути биосинтеза флавоноидов; функции и применение флавоноидов; катаболизм флавоноидов у микроорганизмов; бактерии рода *Azospirillum*. Раздел материалы и методы состоит из четырех подразделов: приборы и материалы, объекты исследования, метод экстракции, метод экстракции фенольных соединений из культуральной жидкости бактерий, тонкослойная хроматография экстрактов фенольных соединений из культуральной жидкости бактерий. Раздел результаты и обсуждения включает три подраздела: анализ динамики роста *A. brasilense* Sp7 в присутствии кверцетина на синтетической и богатой средах, выделение и анализ изменений состава фенольных соединений культуральной жидкости *A. brasilense* Sp7, выращенных в присутствии кверцетина, анализ изменений состава фенольных соединений культуральной жидкости *A. brasilense* Sp7, выращенных в присутствии кверцетина методом ВЭЖХ.

Приборы и материалы. Для осаждения клеток использовались центрифуги Janetzki «Т-24» (Германия), Mini Spin (Eppendorf, Германия).

Культивирование микроорганизмов проводили при постоянном перемешивании на орбитальном шейкере BioSan Ltd “PSU-10” (Латвия). Измерение кислотности проводили с помощью рН-метра METTLER TOLEDO (Китай). Для концентрирования и высушивания образцов применялись: роторный испаритель Heidolph Hei-Vap Value (Германия), сухожаровой шкаф MLW- WS 200(Германия) и СНОЛ «Электродело» -220 в 300 Вт 150 градусов Цельсия (СССР). Взвешивание проводилось на аналитических весах Ohaus Pioneer (Китай). В работе была использована мешалка ММ-5(СССР).

Объекты исследования. В работе использовались следующие микроорганизмы: грамотрицательные микроорганизмы *A. brasilense* Sp7 любезно предоставленные из коллекции микроорганизмов ИБФРМ РАН (Саратов, Россия). *A. brasilense* Sp7 выделен из ризосферы росички лежачей (*Digitaria decumbens*), Бразилия, 1977 год.

Выделение фенольных соединений проводили этилацетатом до и после гидролиза из культуральной жидкости бактерий.

Активность роста определяли по изменению показателя ΔрН.

Анализ экстрактов проводили методами ТСХ и ВЭЖХ.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Экспериментальные исследования проводились на базе кафедры биохимии и биофизики Саратовского национально исследовательского государственного университета им. Н. Г. Чернышевского в период с 2016-2018 года.

Постановка эксперимента. Культивирование бактерий проводили в течение 1, 3 и 7 суток на малатной среде (МС) и богатой среде LB. В присутствии флавоноида - кверцитина (опыт) и без него (контроль). Клетки осаждали центрифугированием и далее упаривали до нужного объема 10 мл. После этого проводилась экстракция фенольных соединений из культуральной жидкости.

Обсуждение результатов исследования. Выбор исследуемого штамма обусловлен его широкой распространенностью, хорошей изученностью, и является представителем ассоциативных бактерий. Содержание флавоноидов в почве варьируется в течение года и зависит от множества факторов как биотической так и абиотической природы. Каневским М. В., 2014 с соавторами были установлены эффективные концентрации флавоноидов по отношению к азоспириллам. Под «эффективными» понимаются минимальные концентрации флавоноидов, обуславливающие изменения состава и структуры гликополимеров поверхности азоспирилл, и не вызывающие бактериостатического эффекта.

Анализ динамики роста *A. brasilense* Sp7 в присутствии кверцетина на синтетической и богатой средах

Культивирование бактерий как на синтетической, так и на богатой средах с добавлением кверцетина приводит к торможению роста на первых сутках, а к седьмым суткам интенсивность роста становится сопоставимой с контролем для богатой среды и выше контроля для синтетической среды (рисунок 1).

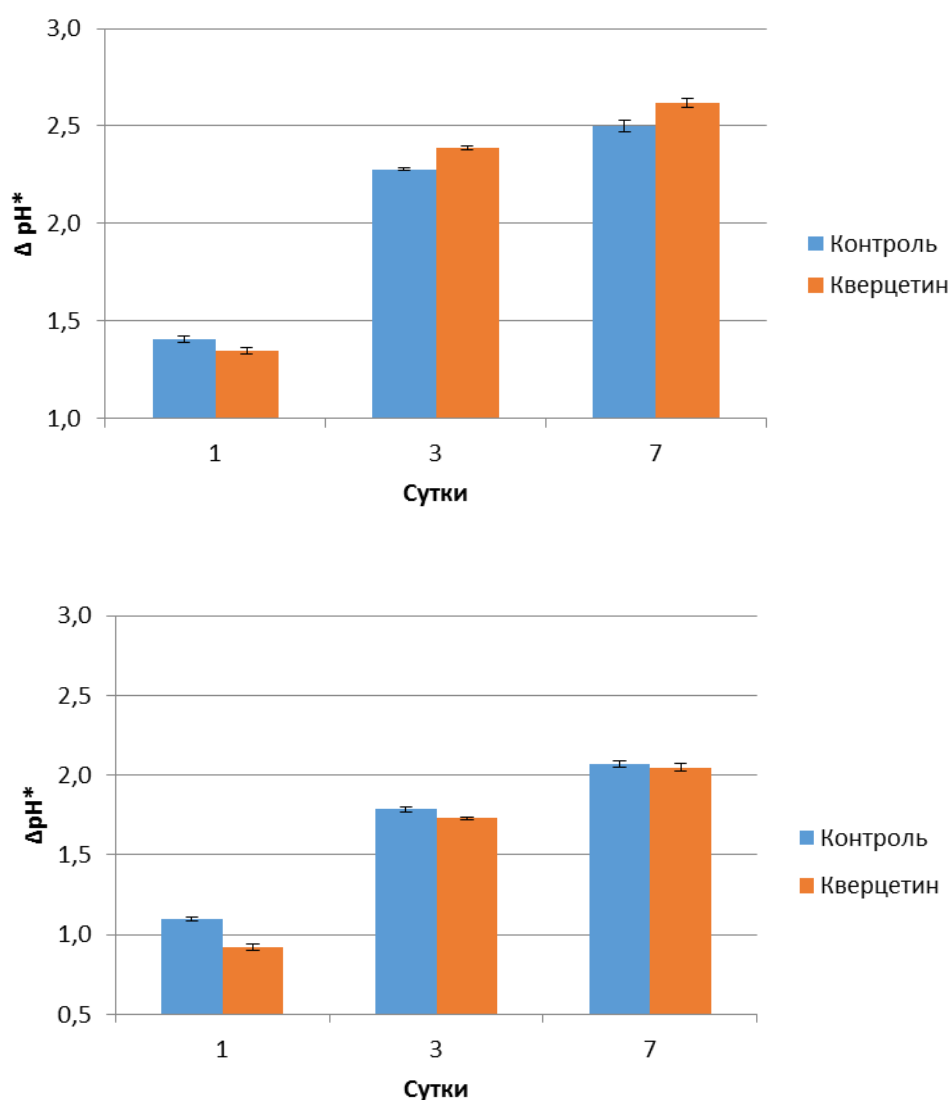


Рисунок 1 – Динамика изменения ΔpH КЖ *A. brasilense* Sp7 в ходе роста на синтетической среде MC и богатой среде LB.

Выделение и анализ изменений состава фенольных соединений культуральной жидкости *A. brasilense* Sp7, выращенных в присутствии кверцетина

Выделение проводили этилацетатом до и после гидролиза из культуральной жидкости бактерий в соответствии с методикой, описанной в разделе «Материалы и методы» пункт 2.4 выпускной квалификационной работы. На первом этапе проводилось выделение кверцетина из среды до роста бактерий, чтобы удостовериться, что не происходит взаимодействия флавоноида с компонентами среды или иной модификации соединения.

Экстракты анализировали методом ТСХ. В результате было установлено, что взаимодействия флавоноида с компонентами среды не происходит, и он выделяется в этилацетатную фракцию в немодифицированном виде. Однако следует отметить, что кверцетин гораздо более полно выделялся из среды LB. Выход составил до 90%, в то время как выход из среды MC не превышал 50%.

При экстракции фенольных соединений из среды MC после роста бактерий выход фенольных соединений составлял менее 20% даже после гидролиза, что создавало трудности для анализа. Уменьшение выхода возможно связано с присутствием солей железа в среде MC, с которыми происходит образование трудноэкстрагируемых комплексов кверцетина. Поэтому дальнейшая работа была проведена с использованием среды LB.

Результаты разделения экстрактов фенольных соединений методом ТСХ показали, что начиная с первых суток роста, бактерии начинают модифицировать кверцетин. Уже к 3 суткам роста кверцетина в среде не остаётся, но появляются новые продукты.

Также дополнительным косвенным подтверждением произошедших изменений может служить цвет КЖ. С увеличением срока культивирования бактерий в среде с кверцетином возрастает интенсивность окраски КЖ. Это может свидетельствовать о накоплении продуктов модификации кверцетина в среде выращивания.

Анализ изменений состава фенольных соединений культуральной жидкости *A. brasilense* Sp7, выращенных в присутствии кверцетина методом ВЭЖХ. Результаты ВЭЖХ показали, что уже на первых сутках (рисунок 3) роста в экстракте, полученном до гидролиза, отсутствует кверцетин, время удержания которого составляет 8 минут, однако на хроматограмме присутствует один мажорный пик, с временем удерживания 21,5 минут. В образце, полученном после гидролиза, увеличивается число пиков, однако пик остаётся. Кроме этого появляется пик с временем удерживания 20,5 минут – фенилуксусная кислота и также отсутствует пик кверцетина. В экстракте также присутствует пик со временем удерживания 14,2 минуты. Полученные результаты свидетельствуют о том, что весь кверцетин в среде подвергается модификации в течение первых суток роста.

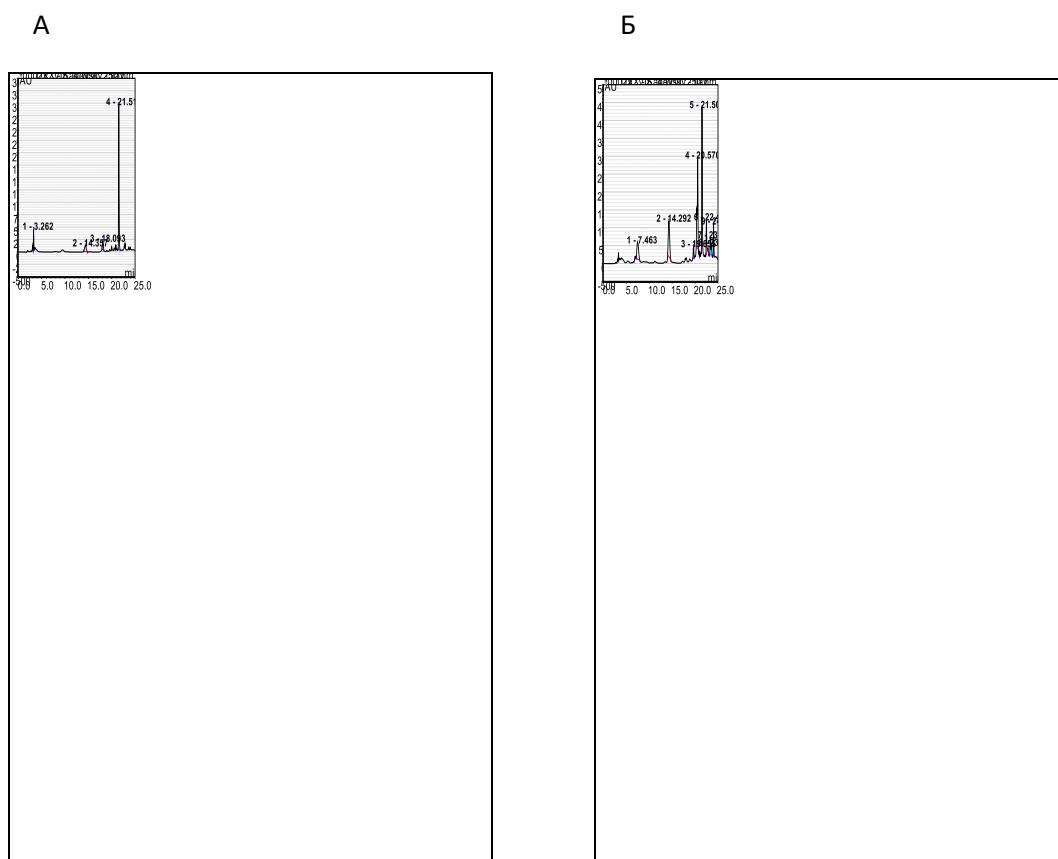


Рисунок 3 – Результат ВЭЖХ экстракта после 1 суток роста до гидролиза (А) и после (Б).

На хроматограмме образца для 3 суток роста бактерий (рисунок 4) до гидролиза число пиков возрастает по сравнению с первыми сутками. Всё ещё присутствует мажорный пик со временем удержания 21,5. А также появляется пик фенилуксусной кислоты. В образце после гидролиза основным мажорным пиком становится пик фенилуксусной кислоты, сохраняется пик со временем удержания 21,5 минут, исчезает пик со временем удержания 14,3 минуты. Также присутствуют минорные пики, в частности появляется пик со временем удерживания 19,7 минут.

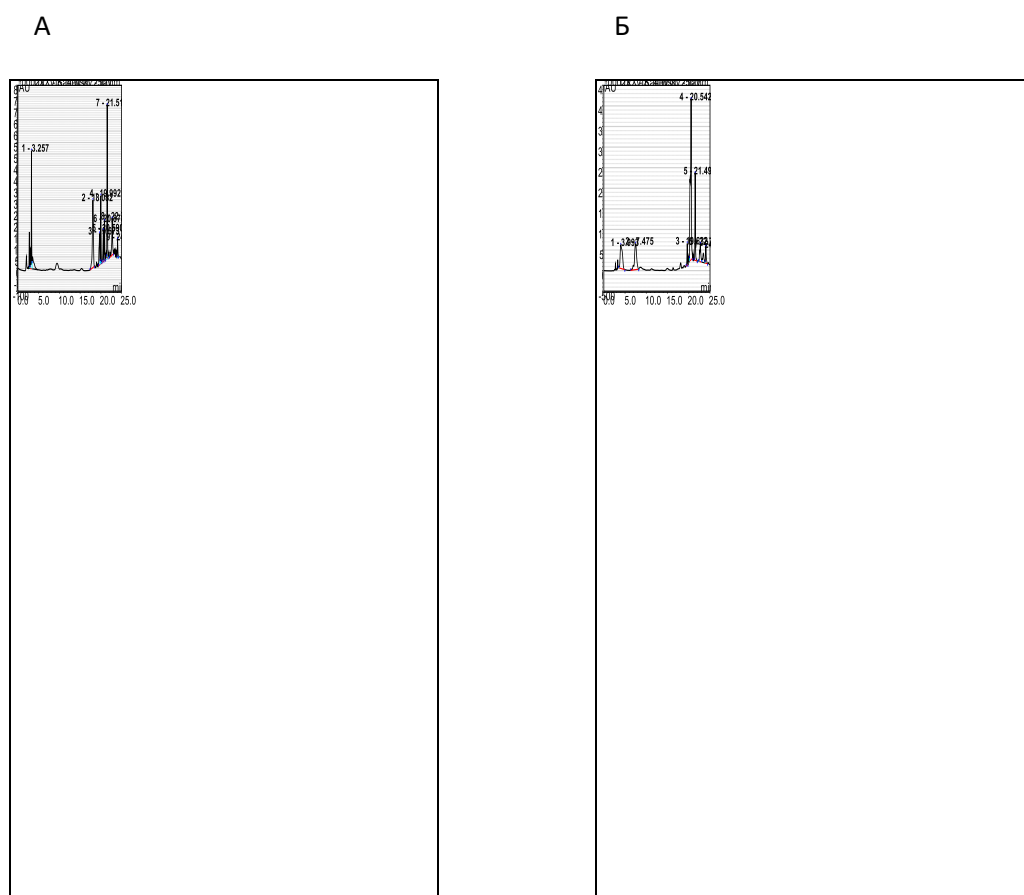


Рисунок 4 – Результат ВЭЖХ экстракта после 3 суток роста *A. brasilense* Sp7 до (А) и после (Б) гидролиза.

На седьмые сутки роста (рисунок 5) в образце до гидролиза пропадает пик со временем удержания 21,5 минут и резко возрастает пик со временем удержания 19,6 минут. Также остаётся пик фенилуксусной кислоты. После

гидролиза мажорным пиком является пик фенилукусной кислоты, а также остаётся пик со временем удержания 19,6 минут.

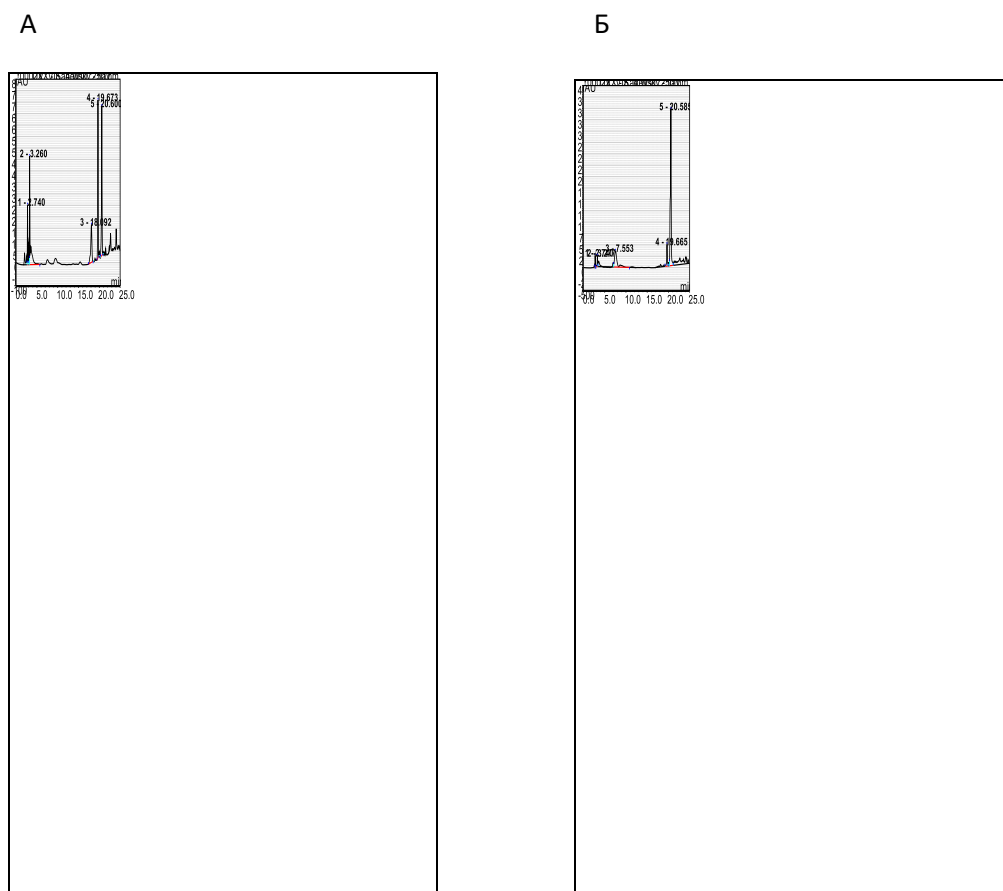


Рисунок 5 – Результат ВЭЖХ экстракта после 7 суток роста *A. brasilense* Sp7 до (А) и после (Б) гидролиза.

Это говорит о том, что к 7 суткам роста азоспириллы полностью модифицируют продукт, полученный из кверцетина на 1 сутках.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования по изучению динамики роста бактерии *A. brasilense* Sp7 в присутствии кверцетина показали, что данный флавоноид не оказывает существенного влияния на рост бактерии.

Методом ВЭЖХ было установлено, что в ходе роста культуры *A. brasilense* Sp7 в присутствии кверцетина происходит модификация флавоноида с формированием различных структур, которые отличаются от контроля и между собой.

Качественный состав продуктов модификации кверцетина в экстрактах изменяется со временем. В экстрактах присутствуют продукты, которые обнаруживаются на протяжении всех суток культивирования, а также есть продукты, которые присутствуют на отдельных этапах.

ВЫВОДЫ

1. Культивирование бактерий как на синтетической, так и на богатой средах с добавлением кверцетина приводит к торможению роста на первых сутках, а к седьмым суткам интенсивность роста становится сопоставимой с контролем для богатой среды и выше контроля для синтетической среды.

2. Азоспириллы способны модифицировать кверцетин в ходе роста. На первых сутках роста бактерии полностью преобразуют кверцетин, при культивировании на богатой среде.

3. К третьим суткам роста бактерии частично преобразуют полученный на первых сутках продукт модификации кверцетина, а к седьмым суткам проводят его полную конверсию.

