

Министерство образования и науки Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н. Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра микробиологии и физиологии растений

**ДЕГРАДАЦИЯ ПОЛИЦИКЛИЧЕСКИХ АРОМАТИЧЕСКИХ
УГЛЕВОДОРОДОВ РИЗОСФЕРНЫМ ШТАММОМ**

***MUSOVACTERIUM GILVUM* PAM1**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 424 группы

Направления 06.03.01 Биология

Биологического факультета

Щербаковой Екатерины Вячеславовны

Научный руководитель
доцент кафедры микробиологии
и физиологии растений, к.б.н., доцент

_____ А.М. Петерсон

Научный консультант
старший научный сотрудник
лаборатории экологической биотехнологии
ИБФРМ РАН, к.б.н

_____ А.Ю. Муратова

Зав. кафедрой микробиологии
и физиологии растений, д.б.н., профессор

_____ С.А. Степанов

Саратов 2017

Введение

Актуальность темы. Полициклические ароматические углеводороды (ПАУ) являются одними из наиболее распространенных загрязнителей окружающей среды. ПАУ содержатся в нефти, продуктах ее переработки, отходах коксохимического и других химических производств, образуются при неполном сгорании различных видов топлива. Поскольку многие из них химически очень устойчивы, то есть попадая в окружающую среду, ПАУ медленно разлагаются, а это приводит к накоплению их в воде и почве. В природных условиях процесс деградации этих соединений протекает очень медленно, но может существенно интенсифицироваться при использовании для очистки загрязненных территорий фиторемедиации.

Фиторемедиация, то есть использование растений и ассоциированных с ними микроорганизмов для разрушения, поглощения и обезвреживания опасных загрязнителей почвы, грунтовых и сточных вод – новое направление в биотехнологии очистки окружающей среды, которое стало активно развиваться в последнее десятилетие. Среди основных механизмов фиторемедиации выделяют усиленную растением ризосферную деградацию загрязнителя в его ризосфере под действием, как корневых выделений самого растения, так и ризосферной микрофлоры [1]. При этом ризобактерии разлагают поллютант, используя его в качестве источника углерода и энергии, что приводит к снижению фитотоксичности загрязнителя и способствует росту и развитию растения. Кроме того, многие ассоциированные с растением микроорганизмы являются продуцентами фитогормонов и тем самым стимулируют развитие его корневой системы. В свою очередь, растения выделяют корневые экссудаты, которые усиливают деградацию поллютантов в ризосфере, непосредственно воздействуя на токсикант и/или поддерживая жизнедеятельность микроорганизмов-деструкторов [2].

Микробная деградация загрязнителя в ризосфере, по всей видимости, имеет свои особенности (например, условия соокисления загрязнителя в

присутствии корневых выделений), а метаболизм поллютантов у ризобактерий может отличаться от метаболизма неризосферных микроорганизмов [3].

Особый интерес вызывает выделение и изучение новых активных штаммов-деструкторов ПАУ, что важно не только для научных исследований, но и для возможного дальнейшего применения их в целях очистки окружающей среды.

Цель и задачи исследования. Целью данной работы являлось изучение деструктивной и ростостимулирующей активности вновь выделенного ризосферного штамма *Mycobacterium gilvum* РАМ1.

Для достижения указанной цели были определены следующие задачи:

1. Идентифицировать ризосферный микроорганизм-деструктор ПАУ.
2. Определить спектр ПАУ, разрушаемых микроорганизмом РАМ1.
3. Выявить динамику роста микроорганизма в среде с ПАУ.
4. Оценить эффективность деструкции различных ПАУ.
5. Выявить влияние янтарной кислоты на эффективность деструкции ПАУ.
6. Определить промежуточные продукты деградации ПАУ.
7. Выявить активность ферментов деградации ароматических субстратов у штамма РАМ 1
8. Оценить влияние исследуемого штамма на рост люцерны посевной (*Medicago sativa* L.).

Материал и методы исследования. Работа проводилась на базе лаборатории экологической биотехнологии Саратовского института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН (г. Саратов).

Объектом исследования являлся штамм бактерий, выделенный из ризосферы люцерны посевной (*Medicago sativa* L.), выращенной в нефтезагрязненной почве.

Для культивирования микроорганизма использовались следующие среды: среда LB и минеральная среда для деструкторов ПАУ. При

необходимости среды уплотняли, добавляя агар-агар в концентрации 2%. В качестве источника углерода в среды добавляли пирен, флуорен, флуорантен, антрацен в концентрации 50 мг/л и фенантрен в концентрации 200 мг/л. В качестве ПАУ-субстратов использовали: нафталин, хризен, фенантрен, флуорен, пирен, флуорантен и антрацен.

В ходе работы использовались стандартные методики для идентификации бактериальных штаммов, по которым выявляли культуральные, морфологические и физиолого-биохимические признаки. Использовался генетический анализ нуклеотидной последовательности 16S рРНК. Постановку всех тестов проводили по общепринятым методикам [4].

Способность штамма подвергать деградации ПАУ определяли с помощью метода Kiyohara [5]. Изучение ростовых характеристик штамма *M. gilvum* РАМ1 в присутствии ПАУ проводили культивируя микроорганизм в колбах с минеральной средой, содержащей пирен, антрацен, флуорен, флуорантен и фенантрен в качестве единственного источника углерода и энергии. Оценку роста культуры осуществляли по изменению оптической плотности культуральной жидкости при $\lambda=440$ нм. Для определения остаточного содержания ПАУ в среде были использованы такие методы как высокоэффективная жидкостная и газовая хроматография. Деструктивную активность штамма по отношению к ПАУ выражали в процентах убыли субстрата относительно прошедшего аналогичную обработку контроля – стерильной среды с ПАУ. Влияние янтарной кислоты на деструкцию ПАУ штаммом РАМ1 определяли выращивая исследуемый микроорганизм на среде для ПАУ-деструкторов с пиреном, флуореном, флуорантеном, антраценом в концентрации 50 мг/л и фенантреном в концентрации 200 мг/л и добавлением янтарной кислоты в концентрации 0,5 г/л.

Для выявления промежуточных продуктов деградации ПАУ с помощью тонкослойной хроматографии использовали метод экстракции метаболитов из культуральной жидкости с помощью этилацетата (1:4). Для

характеристики выявленных веществ для каждого из них определяли значение R_f , которым в тонкослойной хроматографии обозначают миграцию вещества и определяют как отношение расстояния, пройденного пятном, к расстоянию, пройденному фронтом растворителя [6]. Определяли механизм разрыва ароматического кольца, добавляя 20 мкмоль (3,5 мг) протокатехоата натрия в суспензию клеток РАМ1. Появление желтой окраски в течение нескольких минут означало расщепление ароматического кольца в мета-положении. При отсутствии изменения окраски суспензию встряхивали в течение часа при +30°C. Добавляли 1,0 г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 каплю 1,0%-ного нитропруссиды и 0,5 мл нашатырного спирта (30%-раствор). Окрашивание в пурпурный цвет означало наличие расщепления в орто-положении [7].

Определение ферментативных активностей проводили спектрофотометрически.

Оценивали способность штамма оказывать влияние на рост люцерны посевной с помощью инокуляции на проростках.

Структура и объем работы. Работа изложена на 50 страницах, включает в себя введение, 3 главы, заключение, выводы, список использованных источников. Работа проиллюстрирована 5 таблицами и 16 рисунками. Список использованных источников включает в себя 80 наименований.

Основное содержание работы

В главе «Основная часть» представлен анализ литературных данных о химической характеристике ПАУ, о токсичности ПАУ, о микробной деградации ПАУ и о биологической деградации ПАУ в присутствии растений.

В главе «Результаты исследования» представлены экспериментально полученные данные о деструктивной активности штамма в отношении ПАУ. Для предварительной идентификации выделенного штамма РАМ1, изучали его культурально-морфологические и физиолого-биохимические признаки с

использованием техники микроскопирования и выращивания культуры на селективных средах. На основании изучения культурально-морфологических, физиолого-биохимических и генетических характеристик штамм идентифицирован как *Mycobacterium gilvum* PAM1 и занесен в коллекцию ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН как *Mycobacterium gilvum* PAM1 (IBPPM 589).

Способность штамма подвергать деградации различные ПАУ оценивали по наличию зон просветления вокруг колоний микроорганизма. Зоны просветления на чашках с фенантеном, пиреном, флуореном и флуорантеном появлялись уже на 1-2 сутки культивирования, с антраценом – только на 13 сутки. Деградации нафталина и хризена в течение 18 суток эксперимента не наблюдалось.

Изучение ростовых характеристик штамма *M. gilvum* PAM1 показало, что в среде с пиреном наблюдался отчетливый рост штамма, который характеризовался продолжительной логарифмической фазой и достижением стационарной фазы на 24 сутки. В среде с антраценом рост штамма был также медленным, и стационарная фаза регистрировалась лишь на 15 суток. В среде с фенантеном фаза логарифмического роста продолжалась лишь 3 суток, после чего рост штамма отчетливо замедлялся. В среде с флуорантеном и флуореном завершение фазы логарифмического роста наблюдалось на 9 сутки. Из представленных данных видно, что наиболее доступным субстратом для исследованного микроорганизма являлся фенантрен. Наиболее динамичный рост отмечен на средах, содержащих флуорантен и флуорен.

При определении остаточного содержания ПАУ в среде было установлено, что фенантрен на среде без сукцината разрушался практически полностью (деструкция 96%), а добавление янтарной кислоты приводило к снижению деструктивной активности до 36%. Флуорен разрушался микроорганизмом до 86%, добавление янтарной кислоты снижало этот показатель до 11%. Деструкция высокомолекулярных ПАУ, таких как

флуорантен и пирен, на среде без сукцината составляла 66 и 60% соответственно, а при добавлении янтарной кислоты снижалось до 8 и 14%. Таким образом, добавление в среду культивирования в качестве легкодоступного ко-субстрата янтарной кислоты как компонента корневых выделений растений, заметно снижало деструкцию ПАУ: фенантрена на 60%, флуорена на 75%, флуорантена на 58%, пирена на 46%.

Среди промежуточных продуктов деградации в нейтральных фракциях после культивирования РАМ1 в среде с пиреном идентифицирован один из ключевых его метаболитов – гидроксипирен, с антраценом – антрон и антрахинон, с флуореном – 9-гидроксифлуорен, 9-флуоренон и салициловая кислота. В кислой фракции после культивирования РАМ1 в среде с флуорантеном выявлен 9-гидроксифлуорен, с фенантеном – фенантенинхинонфталева кислота. При изучении ферментативной активности у штамма РАМ1 был выявлен фермент протокатехоат-2,3-диоксигеназа. Расщепление ароматического кольца происходит в мета-положении, что было доказано при изучении механизма разрыва ароматического кольца штаммом *M. gilvum*РАМ1.

Установлено, что штамм бактерий *M. gilvum*РАМ1 по-разному влиял на рост корневой системы и надземной части растений. Предпосевная обработка семян взвесью штамма *M. gilvum* РАМ1 в концентрации 10^7 м.к./мл приводила к увеличению длины побега на 3 сутки на 26,4%.

На основании проведенных исследований можно заключить, что выделенный штамм ризобактерий *Mycobacteriumgilvum* РАМ1 представляет большой интерес, т.к. сочетает в себе свойства стимулятора роста растений и деструктора широкого спектра ПАУ, включая высокомолекулярные соединения, такие как пирен и флуорантен. Выделенный штамм может быть использован в технологии био- и фиторемедиации загрязненных ПАУ объектов среды.

Выводы

1. На основании изучения культурально-морфологических, физиолого-биохимических и генетических признаков штамм микроорганизмов РАМ1 – деструктор ПАУ, выделенный ранее из ризосферы люцерны посевной был идентифицирован как *Mycobacterium gilvum*.

2. Изучение спектра деструктивной активности *M. gilvum* РАМ1 показало, что из 6 исследованных ПАУ-субстратов микроорганизм способен подвергать деградации фенантрен, флуорантен, флуорен, пирен и в меньшей степени антрацен, и не способен разрушать нафталин и хризен.

3. Динамика роста *M. gilvum* РАМ1 в среде с пиреном, антраценом, флуореном и флуорантеном характеризовалась продолжительностью лаг-фазы и медленной скоростью роста, а на среде с фенантреном отмечены высокие темпы роста и короткая лаг-фаза.

4. Штамм *M. gilvum* РАМ1 подвергал деградации пирен на 60%, флуорантен на 66%, флуорен на 86%, фенантрен на 96%.

5. Добавление в среду культивирования в качестве легкодоступного ко-субстрата янтарной кислоты как компонента корневых выделений растений, заметно снижало деструкцию ПАУ – фенантрена на 61%, флуорена на 75%, флуорантена на 58%, пирена на 45%.4.

6. С использованием методов ТСХ и ВЭЖХ определены промежуточные продукты деградации ПАУ штаммом *M. gilvum* РАМ1: пирена – гидроксипирен, антрацена – антрон и антрахинон, флуорена – 9-гидроксифлуорен, 9-флуоренон и салициловая кислота, флуорантена – 9-гидроксифлуорен, фенантрена – фенантренхинон и фталевая кислота.

7. Исследование ферментативной активности *M. gilvum* РАМ1 по отношению к ароматическим субстратам позволило выявить расщепление гидроксильированного ароматического кольца микроорганизмом в мета-положении и активность протокатехоат-2,3-диоксигеназы.

8. Установлено, что штамм бактерий *M. gilvum* РАМ1 обладает стимулирующей рост растения активностью, проявляющейся в увеличении прироста побегов люцерны посевной на 26,4%.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Walton, B. T. Rhizosphere microbial communities as plant defense against toxic substances in soil / B. T. Walton, A. M. Holyman, M. M. Perez // J. Bioremediation through Rhizosphere Technology, 1994. Vol.72, № 9. P. 82-92.
2. Siciliano, S.D. Bacterial inoculants of forage grasses that enhance degradation of 2-chlorobenzoic acid in soil / S.D. Siciliano, J.J. Germida // J. Environ. Toxicology and Chemistry, 1997. №6. P.16.
3. Keum, Y.S. Degradation pathways of phenanthrene by *Sinorhizobium* sp. / Y.S. Keum, J.S. Seo, Q.X Li // J. Appl. Microbiol. and Biotechnol, 2005. Vol.46, №9. P.35.
4. Рыбакова, М.Н. Конспект лекций по химии конденсированных ароматических углеводородов: учебное пособие / М.Н. Рыбакова. – М., 1975. 30 с.
5. Kiyohara, H. Rapid screen for bacteria degradation of water-insoluble, solid hydrocarbons on agar plates / H. Kiyohara, Nada O.H., Yana H // J. Appl. Environ. Microbiol, 1982. Vol. 43, №5. P.454-457.
6. Goyal, A.K. Genetics of naphthalene and phenanthrene degradation by *Comamonas testosteroni* / A. Goyal, G. Zylstra // J. Ind. Microbiol. Biotechnol, 1997. Vol.19, №5. P.401-407.
7. Методы общей бактериологии: в 3-х т. / Под ред. Ф.Герхардта. - М.: Мир, 1981. Т.2. 13 с.