

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

Кафедра биохимии и биофизики

ЭКОЛОГО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА  
МАРГАНЕЦОКИСЛЯЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ,  
ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ВЫСОКОМАГНИТНОЙ ПОЧВЫ

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

студентки 2 курса 241 группы  
направления 06.04.01 Биология  
Биологического факультета  
Касаткиной Милены Александровны

Научный руководитель:  
профессор кафедры биохимии  
и биофизики, док. биол. наук

 Е.В. Плешакова  
07.06.2024

Зав. кафедрой биохимии и биофизики,  
док. биол. наук, профессор

 С.А. Коннова  
17.06.2024

Саратов 2024

**Введение.** Марганец (Mn) – распространенный переходный металл, встречающийся в земной коре (примерно 0,1 %). Mn существует в семи различных степенях окисления в диапазоне от 0 до +7, а также Mn(II), Mn(III) и Mn(IV) являются доминирующими видами Mn в природные среды. Циклы Mn среди этих трех валентностей включают реакции окисления, восстановления, сопропорционирования и диспропорционирования, происходящие либо за счет биотических, либо абиотических процессов.

Хотя химическое окисление Mn(II) термодинамически возможно, скорость реакции очень низка, когда pH ниже 8,0 [1]. Однако при околонеутральном pH многие микроорганизмы могут способствовать более быстрому окислению Mn(II), чем химический процесс на 4-5 порядков. Поэтому природные оксиды марганца являются преимущественно биогенными.

Способность к окислению Mn(II) была обнаружена у разнообразных бактерий, грибов и водорослей, однако физиологическая роль окисления Mn(II) специфическими микроорганизмами остается неясной.

С точки зрения механизма окисления Mn(II), как биотического (ферментативного), так и абиотического (химического, такого как pH, радикалы и щелочные метаболиты) подтверждено, что данные процессы способствуют окислению Mn(II) у различных микроорганизмов, что позволяет предположить наличие сложного механизма окисления Mn(II).

Цель настоящей работы состояла в изучении эколого-функциональных и биологических свойств марганцеоксиляющих микроорганизмов, выделенных из высокомагнитной почвы.

Для реализации поставленной цели решались следующие задачи:

1. Определить максимальную толерантную концентрацию (МТК) и минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) Mn(II) для микроорганизмов, выделенных из высокомагнитной почвы, при их культивировании на плотной среде и в жидких средах.

2. У микробных штаммов, отобранных по результатам оценки уровня устойчивости к Mn (II), изучить показатели роста в условиях периодического культивирования в жидкой среде, содержащей Mn (II).

3. Произвести количественную оценку убыли Mn (II) из среды культивирования отобранных микробных штаммов и выявить взаимосвязь между данным показателем и ростовыми характеристиками штаммов.

4. Изучить морфометрические, морфологические и физиолого-биохимические признаки марганецоксиляющих микроорганизмов, а также их эколого-функциональные свойства, включая: показатель гидрофобности клеточной поверхности, адгезивную активность к жидкому и твёрдому субстрату, алкало- и галотолерантность, устойчивость к действию тяжёлых металлов и антибиотиков.

В качестве объекта исследования использовались марганецоксиляющие микроорганизмы (9 штаммов) и два штамма железооксиляющих микроорганизмов (*Bacillus megaterium* 69.3 и *B. megaterium* 69.5), выделенные ранее из почвенных микробсообществ г. Медногорска (Оренбургская область, Россия) [2]. Два штамма железооксиляющих микроорганизмов *B. megaterium* 69.3 и *B. megaterium* 69.5 были идентифицированы по совокупности изученных культурально-морфологических, физиолого-биохимических признаков и результатов молекулярного типирования [3], последовательности 16S рРНК данных штаммов приняты в GenBank NCBI под регистрационными номерами MK764545 и MK764687 соответственно.

Марганецоксиляющие микроорганизмы изолировали на селективной среде следующего состава, г/л:  $MnSO_4 \times 5H_2O$  – 4,72;  $(NH_4)_2SO_4$  – 0,5;  $NaNO_3$  – 0,5;  $K_2HPO_4$  – 0,5;  $MgSO_4 \times 7H_2O$  – 0,5; лимонная кислота – 10,0; сахароза – 2,0; пептон – 1,0; pH 7,0 [4]. Микроорганизмы хранились при 4 °С на столбиках 6 %-ной агаризованной селективной среды под стерильным вазелиновым маслом с регулярными пересевами.

Для определения максимальной толерантной концентрации (МТК) и минимальной ингибирующей концентрации (МИК) Mn (II) для исследуемых микроорганизмов (11 штаммов) оценивали их способность к росту на агаризованной LB-среде, содержащей Mn (II) в диапазоне концентраций: 0; 0,2; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 4,0; 5,0; 7,5; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0; 50,0; 100,0; 150,0; 200,0; 250 ммоль/л. Для двух штаммов (55.2 и *V. megaterium* 69.5), которые показали положительный рост на ранее используемых концентрациях, концентрационный ряд был продолжен: 300,0; 350,0; 400,0; 450,0; 500,0. У отобранных по результатам оценки МИК и МТК микробных штаммов (55.2 и *V. megaterium* 69.5) изучали динамику роста в жидких средах: питательной LB-среде и селективной среде для марганцеоксилирующих микроорганизмов, содержащих возрастающие концентрации Mn (II): 0,5; 1,0; 2,0; 5,0; 10,0; 20,0; 50,0; 100,0; 150,0; 200,0; 250,0 ммоль/л.

Для измерения массовой концентрации общего марганца в культуральной среде использовали метод с использованием окисления до перманганат-ионов согласно ГОСТ 4974-2014 [5].

Морфолого-культуральные и физиолого-биохимические признаки микроорганизмов исследовали по стандартным методикам [6]. Идентификацию микроорганизмов проводили по результатам изучения совокупности морфолого-культуральных и физиолого-биохимических признаков согласно определителю бактерий Берджи [7].

Адгезию микроорганизмов к *n*-гексадекану изучали с помощью МАТН-метода (Microbial Adhesion to Hydrocarbons). Адгезивную способность по отношению к твёрдым фазам, в частности к полистиролу, исследовали на основе 96 луночных полистирольных микропланшетов (Медполимер, Санкт-Петербург) с использованием фосфатного буфера (рН 7,0) и окрашиванием прикреплённых клеток 1%-м водным раствором кристаллического фиолетового. Для оценки показателя гидрофобности (ПГ) клеточной поверхности изучаемых нами штаммов, применяли метод Е.В. Серебряковой с соавт. [8], который основывается на адсорбции бактериальных клеток на

поверхности капель хлороформа. Бактерии для этого анализа получали двумя способами: 1) выращиванием в течение 2-х суток на твердой агаризованной питательной среде (МПА) в чашках Петри и 2) в жидкой минеральной среде М9 с глицерином в качестве единственного источника углерода и энергии.

Устойчивость изучаемых микроорганизмов к действию тяжелых металлов определяли визуально по росту культур на МПА с добавлением диапазона концентраций следующих солей тяжелых металлов:  $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{CdCl}_2$ ,  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{NiSO}_4$  и  $\text{FeSO}_4$ . Предварительно проавтоклавированные (при 1 атм.) растворы солей ТМ добавляли в МПА непосредственно перед розливом питательной среды в чашки Петри до конечной концентрации соль/металла в среде, мг/л:  $\text{CuCl}_2/\text{Cu}^{2+}$  – 40/19, 70/33, 100/47, 300/94, 400/142, 500/189, 600/236, 283;  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2/\text{Pb}^{2+}$  – 40/25, 140/88, 240/150, 600/375;  $\text{CdCl}_2/\text{Cd}^{2+}$  – 20/12, 40/24, 70/43, 100/61;  $\text{ZnSO}_4/\text{Zn}^{2+}$  – 40/16, 140/56, 240/97, 440/178;  $\text{NiSO}_4/\text{Ni}^{2+}$  – 20/8, 40/15, 80/30, 100/38;  $\text{FeSO}_4/\text{Fe}^{2+}$  – 20/7, 40/15, 80/29, 100/37.

Определение антибиотикочувствительности бактериальных штаммов проводили диско-диффузионным методом [9]. Использовались бумажные диски с антибактериальными препаратами в стандартных концентрациях. Чувствительность штаммов определяли по их отношению к воздействиям различным группам антибиотиков:  $\beta$ -лактамы – ампициллин, бензилпенициллин; аминогликозиды – неомицин, гентамицин, канамицин; препараты группы левомецетина – левомецетин; группы макролидов азалидов – азитромицин; антибиотики других химических групп – ванкомицин, полимиксин.

**Структура магистерской работы.** Работа состоит из введения, основной части, заключения, выводов, списка использованных источников. Литературный обзор составлен на основе анализа 74 источников и включает в себя следующие вопросы: общее представление о токсикологических свойствах марганца и путях его микробиологического окисления, характеристику марганцеокисляющих микроорганизмах, а также

физиологическую роль и особенности механизма окисления марганца в микробных клетках. Магистерская работа написана грамотно, содержит обстоятельный обзор литературы и включает 79 страниц машинописного текста. Работа хорошо иллюстрирована, содержит 23 рисунка и 8 таблиц, что необходимо для наглядного представления полученных данных.

**Научная новизна и значимость работы:** Из высокомагнитной почвы выделены новые штаммы марганцеокисляющих микроорганизмов, которые идентифицированы как: *Bacillus simplex* 55.2, *B. simplex* 13.2 и *Listeria murrayi* 13.4. Результаты исследования эколого-функциональных и биологических свойств *B. megaterium* 69.5, *B. simplex* 55.2, *B. simplex* 13.2 и *L. murrayi* 13.4 свидетельствовали об их способности удалять высокие концентрации Mn (II) из водной среды, полирезистентности к тяжелым металлам, алкало- и галотолерантности. Для данных микроорганизмов характерны: высокая адгезивная активность, значительное увеличение гидрофобности клеточной поверхности при культивировании с углеводородным субстратом, отсутствие гемолитической, липазной и лецитиназной активности и наличие высокой чувствительности к действию антибиотиков различных групп. Все выявленные свойства изученных микробных штаммов доказывают перспективу использования их в биотехнологии очистки воды от повышенного содержания марганца.

**Основное содержание работы.** В ходе скрининговых исследований была показана высокая устойчивость к ионам Mn (II) у 9 из 11 исследованных микробных штаммов, изолированных из микробоценозов высокомагнитных почв г. Медногорска. Выявлены два микробных штамма с максимальной устойчивостью: 55.2 и *B. megaterium* 69.5, МТК Mn (II) для них составила 300,0 и 350,0 ммоль/л, МИК – 350,0 и 450,0 ммоль/л соответственно. Была продемонстрирована высокая резистентность микробных штаммов 55.2 и *B. megaterium* 69.5 к диапазону концентраций Mn (II): от 0,5 до 250,0 ммоль/л при их культивировании в питательной и селективной жидкой среде. Отмечено, что максимальный рост обоих

штаммов наблюдался при концентрации марганца в среде культивирования 10 ммоль/л.

Выделенные из высокомагнитной почвы микробные штаммы с установленной максимальной резистентностью к Mn (II) и способностью к удалению Mn (II) из водной среды по совокупности изученных нами культурально-морфологических и физиолого-биохимических признаков были идентифицированы как: *Bacillus simplex* 55.2, *B. simplex* 13.2 и *Listeria murrayi* 13.4. Установлено, что микробные штаммы *B. megaterium* 69.5, *B. simplex* 55.2, *B. simplex* 13.2 и *L. murrayi* 13.4 способны расти в условиях повышенной щёлочности и минерализации среды (pH 7-10; 10 % NaCl). Показано отсутствие гемолитической, липазной и лецитиназной активности у штаммов, что косвенно свидетельствует о непатогенности микроорганизмов (таблица 1).

Таблица 1 – Ростовые и ферментативные свойства микроорганизмов

Микроорганизмы	Рост в условиях								Активность		
	pH			содержание NaCl, % по объёму					гемоли- тическая	липаз- ная	лецити- назная
	5	9	10	2	5	7	10	15			
<i>Bacillus megaterium</i> 69.5	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Bacillus simplex</i> 13.2	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Bacillus simplex</i> 55.2	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Listeria murrayi</i> 13.4	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-

Примечания: «-» – отсутствие роста; «+» – заметный рост.

В ходе исследований с помощью метода окрашивания эндоспор по методу Шеффера-Фултона у изучаемых микроорганизмов были установлены закономерности при образовании спор через 48 часов инкубации на плотной

питательной среде. Продемонстрировано, что максимальное количество спор в образце наблюдалось у штамма *B. simplex* 13.2, при этом бóльшая часть спор вышла из бактериальных клеток. У микроорганизма *L. murrayi* 13.4 бóльшая часть спор при таких же условиях культивирования осталась внутри клеток (рисунок 1).

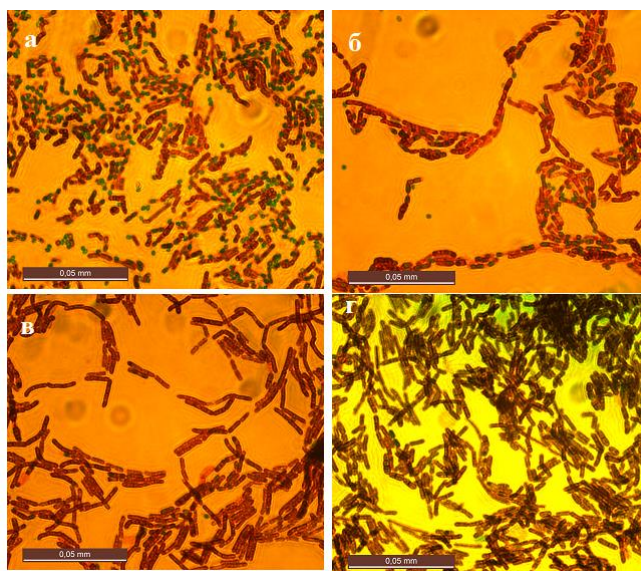


Рисунок 1 – Результаты окрашивания эндоспор методом Шеффера-Фултона через 48 часов инкубации на плотной питательной среде: а) *Bacillus simplex* 13.2; б) *Listeria murrayi* 13.4; в) *B. simplex* 55.2; г) *B. megaterium* 69.5

Для одного из отобранных микробных штаммов (*B. simplex* 55.2) с помощью сканирующего зондового микроскопа был исследован рельеф поверхности при культивировании микроорганизма в питательной среде и в селективной среде с марганцем (рисунок 2).

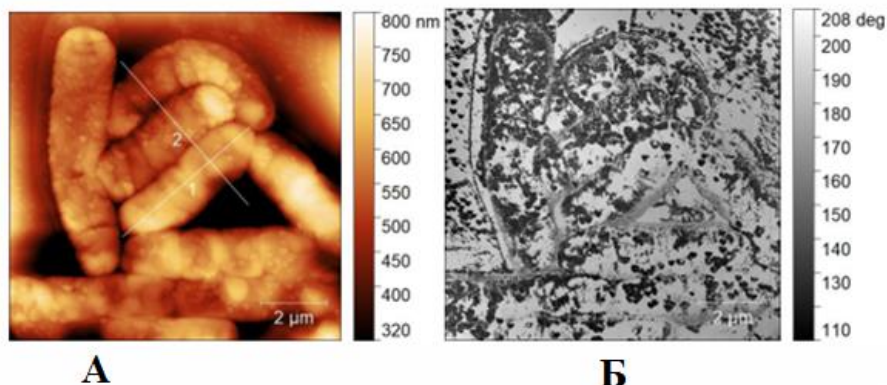


Рисунок 2 – Изображение профиля поверхности *Bacillus simplex* 55.2



На АСМ-изображениях была видна палочковидная форма бактерий с линейными цепочками углублений. Бактерии имеют статистический размер – длина до 5 мкм, ширина до 2,5 мкм и высотой до 5 мкм. На изображении фазового контраста наблюдались отчётливые неоднородные области поверхности, о чём свидетельствует соответствующий сдвиг фазы.

Изучена динамика роста *B. simplex* 55.2 и *B. megaterium* 69.5 в условиях периодического культивирования в жидкой среде с 2 ммоль/л Mn (II). Через 7 сут. культивирования вес биомассы *B. megaterium* 69.5 увеличился в 5,5 раза, оптическая плотность культуральной среды в 4 раза по сравнению с показателями через 1 сут., что было в несколько раз выше показателей у *B. simplex* 55.2. Оба микроорганизма активно росли в данных условиях и снижали содержание Mn (II) в среде культивирования на 50 и 66 % за 7 сут.

Получены результаты изучения адгезивной активности микроорганизмов по отношению к жидким углеводородам (*n*-гексадекан) и твёрдым поверхностям (полистирол). Степень адгезии к *n*-гексадекану и полистиролу у микроорганизмов составила: *B. simplex* 55.2 – 62,0 и 81,2 %, *B. simplex* 13.2 – 59,0 и 78,6 %, *B. megaterium* 69.5 – 64,8 и 60,4 %, *L. murrayi* 13.4 – 69,2 и 72,6 %. Полученные результаты могут быть использованы при подборе оптимального режима иммобилизации высокоустойчивых к марганцу (II) микроорганизмов при применении их в биотехнологических процессах ремедиации вод, загрязнённых тяжёлыми металлами.

Гидрофобно-гидрофильную природу поверхности микроорганизмов изучили с помощью методики Е.В. Серебряковой. Согласно результатам, ПГ у *B. simplex* 13.2, при культивировании на питательной среде составлял 36,7 %, при выращивании бактерий в минеральной среде с глицерином ПГ был значительно выше – 82,5 %. ПГ у *B. megaterium* 69.5 показал самое низкое значение 1,7 % при культивировании на МПА, но 36,2 % при культивировании на среде с глицерином. Сходные значения ПГ наблюдались у *L. murrayi* 13.4 и *B. simplex* 55.2.

Результаты изучения индивидуальной устойчивости микроорганизмов к действию тяжёлых металлов показали, что все исследованные микроорганизмы хорошо росли на среде с  $\text{CuCl}_2$  (40-700 мг/л),  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  (40-240 мг/л),  $\text{NiSO}_4$  (20-100 мг/л) и  $\text{FeSO}_4$  (20-100 мг/л), что свидетельствует о наличии перекрестной устойчивости изученных бактерий к данным ТМ.

Высокая концентрация  $\text{Pb}$  (II) в среде (600 мг/л) ингибировала рост бактерий: *L. murrayi* 13.4 и *B. simplex* 55.2, при это низкие и средние концентрации соли свинца не угнетали рост данных штаммов. Остальные бактерии хорошо росли при всех концентрациях  $\text{Pb}$  (II) в среде. Бактериальный штамм *B. simplex* 13.2 отличался отчетливым ростом на среде, содержащей кадмий (40 мг/л). Рост всех остальных микроорганизмов при содержании в среде кадмия в минимальном количестве 20 мг/л ингибировался.

Также была изучена чувствительность четырёх исследуемых микробных штаммов к антибиотикам разных групп, наиболее часто и широко используемых в медицинской практике. В ходе работы обнаружено, что бактерии обладают сходным уровнем чувствительности к антибиотикам, использованным в данной работе. Так, все бактерии, за исключением *B. simplex* 55.2, при росте на полноценной питательной среде проявили высокую степень чувствительности ко всем изучаемым препаратам. Бактерии *B. simplex* 55.2 отличались средним уровнем чувствительности к неомицину и полимиксину.

**Заключение:** Таким образом, в результате проведённых исследований доказано, что высокомагнитные почвы представляют собой источник высокоспециализированных микроорганизмов, обладающих способностью расти при неблагоприятных условиях окружающей среды (рН 9-10), а также в условиях повышенной солёности, и являющихся условно экологически безопасными. Учитывая, что данные микроорганизмы способны удалять высокие концентрации  $\text{Mn}$  (II) из водной среды, они представляют перспективу для использования их в биотехнологии очистки воды.

**Выводы:** 1. Показано, что 9 из 11 исследованных микробных штаммов, изолированных из высокомагнитной почвы, проявили высокую устойчивость к ионам марганца (II) при культивировании на плотной среде. МТК Mn (II) для максимально устойчивых штаммов (55.2 и *B. megaterium* 69.5) составила 300,0 и 350,0 ммоль, МИК – 350,0 и 450,0 ммоль соответственно. Данные микроорганизмы росли в питательной и селективной жидкой среде, содержащей 0,5-250,0 ммоль Mn (II), с максимальным ростом при 10 ммоль Mn (II).

2. По результатам изучения совокупности морфометрических, культурально-морфологических и физиолого-биохимических признаков микроорганизмы с максимальной резистентностью к Mn (II) идентифицированы как: *Bacillus simplex* 55.2, *B. simplex* 13.2 и *Listeria murrayi* 13.4.

3. Показано, что через 7 сут. периодического культивирования в жидкой среде, содержащей 2 ммоль/л Mn (II), вес биомассы *B. megaterium* 69.5 увеличился в 5,5 раза, *B. simplex* 55.2 – в 3,7 раза относительно значений через 1 сут. культивирования, оптическая плотность культуральной среды *B. megaterium* 69.5 увеличилась в 4 раза, *B. simplex* 55.2 – в 2 раза по сравнению с исходной посевной дозой. Удельная скорость роста *B. megaterium* 69.5 через 7 сут. культивирования была выше, чем у *B. simplex* 55.2 примерно в 2 раза. *B. simplex* 55.2 снижал содержание Mn (II) на 66 %, *B. megaterium* 69.5 – на 50 %.

4. Степень адгезии к н-гексадекану и полистиролу у микроорганизмов составила: *B. simplex* 55.2 – 62,0 и 81,2 %, *B. simplex* 13.2 – 59,0 и 78,6 %, *B. megaterium* 69.5 – 64,8 и 60,4 %, *L. murrayi* 13.4 – 69,2 и 72,6 %. Показатель гидрофобности клеточной поверхности у *B. megaterium* 69.5, *L. murrayi* 13.4, *B. simplex* 55.2, *B. simplex* 13.2 при культивировании на МПА составил 1,7-36,7 %, в минеральной среде с глицерином был значительно выше – 36,2-82,5 %.

5. Установлено, что *B. megaterium* 69.5, *B. simplex* 55.2, *B. simplex* 13.2 и *L. murrayi* 13.4 способны расти в условиях повышенной щёлочности и минерализации среды (рН 10; 10 % NaCl), на среде с CuCl<sub>2</sub> (40-700 мг/л), Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (40-240 мг/л), NiSO<sub>4</sub> (20-100 мг/л) и FeSO<sub>4</sub> (20-100 мг/л). Только один микроорганизм – *B. simplex* 13.2 рос на среде, содержащей 40 мг/л Cd<sup>2+</sup>. Показано отсутствие гемолитической, липазной и лецитиназной активности у исследованных микроорганизмов и наличие высокой чувствительности к действию антибиотиков различных групп.

#### **Список использованных источников**

- 1 Hansel, C. M. Mn(II) oxidation by an ascomycete fungus is linked to superoxide production during asexual reproduction / C. M. Hansel, C. A. Zeiner, C. M. Santelli // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2012. – V. 109, N 31. – P. 12621-12625.
- 2 Микробиологическая и биохимическая индикация почв города Медногорска / Е. В. Плешакова [и др.] // Агрохимия. – 2016. – № 1. – С. 66-73.
- 3 Evaluation of the ecological potential of microorganisms for purifying water with high iron content / E. V. Pleshakova [et al.] // Water. – 2021. – V. 13: Article ID 901.
- 4 Assessment of heavy metal pollution from a Fe-smelting plant in urban river sediments using environmental magnetic and geochemical methods / C. Zhang [et al.] // Environ. Pollut. – 2011. – V. 159. – P. 3057-3070.
- 5 ГОСТ 4974-2014. Вода питьевая. Определение содержания марганца фотометрическими методами, 2015. – 23 с.
- 6 Нетрусов, А.И. Практикум по микробиологии / А.И. Нетрусов, М.А. Егорова, Л.М. Захарчук. – М.: Изд-во Академия, 2005. – 608 с.
- 7 Определитель бактерий Берджи: В 2 т. / Дж. Хоулт., Н. Криг, П. Снит и др. – М.: Мир, 1997. – 1232 с.

- 8 Ягафарова, Г. Г. Утилизация экологически опасных буровых отходов / Г. Г. Ягафарова, В. Б. Барахнина // Нефтегазовое дело. – 2006. – № 2. – С. 2-17.
- 9 Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: Методические указания. – М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. – 91 с.

