

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

Кафедра биохимии и биофизики

**УСТОЙЧИВОСТЬ ШТАММА РИЗОБИЙ *NEORHIZOBIUM*
RHENANTHRENICLASTICUM RSF11 К ТЯЖЕЛЫМ МЕТАЛЛАМ И
ДЕГРАДАЦИЯ ИМ ФЕНАНТРЕНА**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

студентки 4 курса 421 группы

направления подготовки

06.03.01 Биология

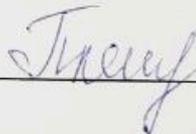
Биологического факультета

Растерковской Маргариты Витальевны

Научный руководитель:

профессор кафедры биохимии

и биофизики, док. биол. наук, доцент



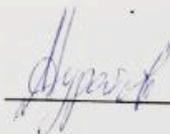
Е.В. Плешакова

Научный консультант:

Зав. лабораторией экологической

биотехнологии ИБФРМ РАН,

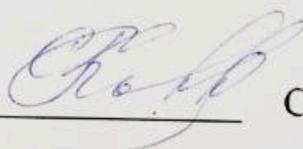
док. биол. наук



А.Ю. Муратова

Зав. кафедрой биохимии и биофизики,

док. биол. наук, профессор



С.А. Коннова

Саратов 2025

Введение. Полициклические ароматические углеводороды (ПАУ), образующиеся в результате неполного сгорания органических материалов, таких как нефть, уголь и древесина, относятся к приоритетным загрязняющим веществам окружающей среды. Они могут вызывать мутагенез, онкогенез, тератогенез, ингибирование роста, ускорение старения, токсикогенез и нарушение работы иммунологических систем, что приводит как к нарушению индивидуального развития и изменению генофонда, так и к нежелательным отклонениям в ценозах.

Фенантрен, представитель ПАУ, исследуемый в данной работе, не вызывает канцерогенез, хотя и может вызывать фотосенсибилизацию и аллергические реакции. Фенантрен является продуктом неполного сгорания древесины и ископаемого топлива, присутствует в воде, воздухе и пищевых продуктах. Он используется как модельный объект в исследованиях биологической деградации ПАУ.

Перспективными методами выведения из биосферы ПАУ являются биологические методы, основанные на способности микроорганизмов разрушать и утилизировать ароматические субстраты. Установлено, что биodeградация ПАУ микроорганизмами осуществляется интенсивнее в ризосфере растений, чем непосредственно в почве.

Тяжелые металлы зачастую являются сопутствующими загрязнителями при нефтедобыче, нефтепереработке, металлургии и других видах антропогенной деятельности. Их опасность заключается в том, что они способны накапливаться в организме до опасных концентраций, при которых они становятся токсичными. Одним из видов биоремедиации загрязненных тяжелыми металлами почв является биоаккумуляция их микроорганизмами и растениями.

Целью настоящей работы являлось исследование деградации трехкольцевого ПАУ фенантрена ризосферной бактерией *Neorhizobium*

phenanthreniclasticum и влияния на этот процесс ионов никеля, кадмия, меди и цинка.

Поставленные задачи:

- 1) Оценить рост микроорганизма на среде с фенантrenom в качестве единственного источника углерода и энергии, определить деградацию фенантрена и идентифицировать его ключевые метаболиты.
- 2) Определить активность ферментов, вовлеченных в деградацию ПАУ – фенантренхинон редуктазы и протокатехоат диоксигеназы – и влияние на них ионов никеля.
- 3) Охарактеризовать механизм устойчивости ризобии *Neorhizobium phenanthreniclasticum* Rsf11 к никелю, кадмию, меди и цинку.

Материалы и методы. В работе использовали штамм бактерий *Neorhizobium phenanthreniclasticum* Rsf11 (IBPPM 350), способный подвергать деградации ПАУ. Микроорганизм был выделен из ризосферы люцерны посевной (*Medicago sativa* L.), выращенной на нефтезагрязненной почве, и хранится в Коллекции ризосферных микроорганизмов Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН (ИБФРМ РАН).

Для культивирования микроорганизма-ПАУ-деструктора использовали питательную среду R2A.

Оценку роста и способности к биodeградации фенантрена проводили, выращивая микроорганизм на среде с фенантrenom. Остаточное содержание фенантрена в среде после культивирования микроорганизма определяли методом газовой хроматографии.

Анализ промежуточных метаболитов деградации фенантрена проводили с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ) методом разделения концентрированных этилацетатных экстрактов культуральной жидкости на алюминиевых пластинах (5 x 10 см) с силикагелем 60 F254 (Merck, Германия).

Активности внутриклеточных ферментов бактерии ПАУ-хинонредуктазы и протокатехоат дикосигеназы определяли, используя грубый ферментный препарат, представляющий бесклеточный экстракт, полученный после разрушения микробных клеток. Полученный надосадочный материал использовали в качестве неочищенного ферментного препарата.

Содержание белка в бесклеточных фракциях определяли методом Бредфорд.

Активность бактериальных ферментов, связанных с деградацией ПАУ, определяли спектрофотометрически на спектрометре Evolution 60 (Thermo Scientific, США).

Активность фенантренхинон редуктазы (PQR, EC 1.6.5.5) измеряли путем мониторинга окисления НАДН при 340 нм. Активность протокатехоат-2,3-диоксигеназы (2,3-PCD, EC 1.13.11.x) определяли, наблюдая за накоплением 2-гидроксимуконowego полуальдегида при 375 нм.

Удельную активность всех ферментов выражали в единицах (Ед), определяемых как мкмоль катализируемого субстрата в минуту на мг белка.

Влияние никеля на активность ферментов оценивали путем внесения ионов никеля (в конечной концентрации 0,1-5 мМ) в реакционные смеси и измерением остаточной ферментативной активности.

Для изучения механизмов устойчивости микроорганизма к тяжелым металлам проводилось культивирование на питательной среде R2A с добавлением растворимых солей металлов в концентрациях 0,1, 0,2 и 0,5 ммоль/л. В качестве контроля использовали среду без микроорганизма, содержащую ТМ каждой концентрации. По окончании культивирования, оценивали рост микроорганизма, путем измерения оптической плотности на спектрометре Evolution 60 (Thermo Scientific, США). После определения оптической плотности каждый раствор переносили в предварительно взвешенные и пронумерованные центрифужные пробирки и проводили серию центрифугирований с отбором супернатантов. После первого и второго

центрифугирований в пробирки добавлялась дистиллированная вода (по 10 мл), после третьего – раствор ЭДТА (3 мл, 10 ммоль/л). Водные порции супернатантов объединялись. Пробирки с биомассой высушивали до постоянного веса, закрывали крышками и хранили в холодильнике до анализа.

Для исследования механизмов устойчивости микроорганизма к ТМ определяли содержание ТМ в клеточной биомассе, смыве с поверхности клеток и культуральной жидкости в присутствии различных концентраций ТМ (0; 0,1; 0,2; 0,5 ммоль/л) с помощью атомно-абсорбционного спектрометра Thermo Scientific iCE 3500 (Thermo Scientific, США).

Бакалаврская работа включает содержание, список сокращений, введение, 3 главы (обзор литературы, материалы и методы, результаты исследований и их обсуждение), заключение, выводы и список использованных источников, включающий 57 источников на русском и английском языках. Работа изложена на 45 страницах машинописного текста. Работа проиллюстрирована 13 рисунками.

Основное содержание работы. Рост бактерии *N. phenanthreniclasticum* Rsf11 на среде с фенантrenom достигал максимума, 0,33 ед. оптической плотности на 10 сутки культивирования. Деградация фенантрена к 10 суткам культивирования составила 58 % – содержание фенантрена в культуральной жидкости уменьшилось на 5,6 мг (рисунок 1).

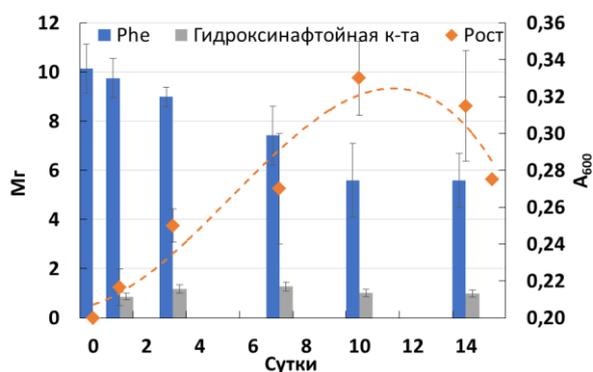
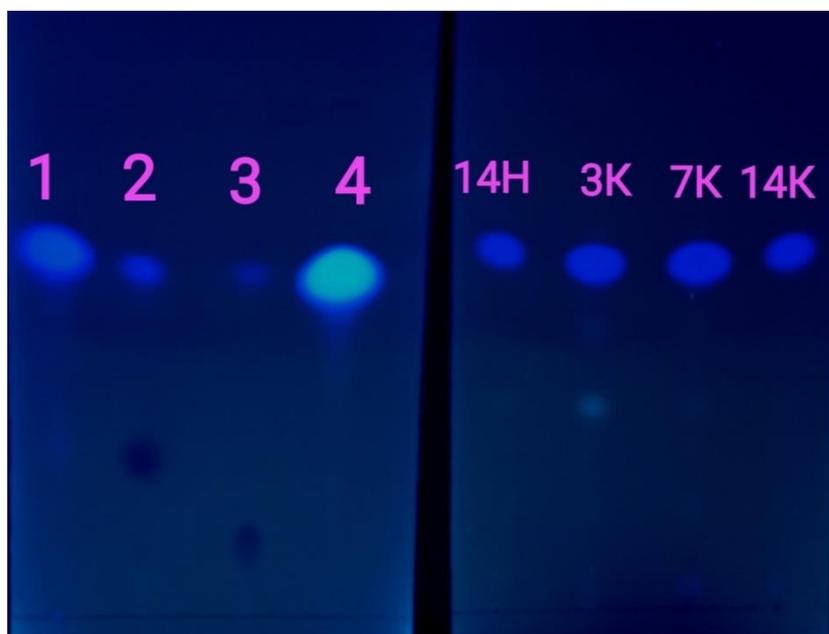


Рисунок 1 – Рост *Neorhizobium phenanthreniclasticum* Rsf11 и деградация фенантрена в минеральной среде

К 14 суткам культивирования деградация фенантрена исследуемым микроорганизмом достигала 58 % и сопровождалась накоплением в среде основного метаболита – 1-гидрокси-2-нафтойной кислоты. Метаболит был выявлен с помощью метода ТСХ (рисунок 2).



1 – гидроксинафтойная кислота, 2 – карбоксибензальдегид, 3 – фталевая кислота, 4 – салициловая кислота; Н – нейтральный экстракт, К – кислые экстракты, 3, 7, 14 – сутки культивирования

Рисунок 2 – Хроматограмма экстрактов культуральной жидкости, содержащей продукты деградации фенантрена

У штамма *N. phenanthreniclasticum* Rsf11 была выявлена активность ферментов, вовлеченных в метаболизм фенантрена – фенантренхинон редуктазы и протокатехоат диоксигеназы – на уровне 6 и 1 мкмоль/мин/мг белка соответственно. Влияние никеля на активность ферментов оценивали путем внесения ионов никеля (до конечной концентрации 0,1-5,0 ммоль/л) в реакционные смеси и измерением остаточной ферментативной активности. Остаточная активность фенантренхинон редуктазы в присутствии ионов никеля

не изменялась (рисунок 3), тогда как активность протокатехоат диоксигеназы возрастала (рисунок 4).

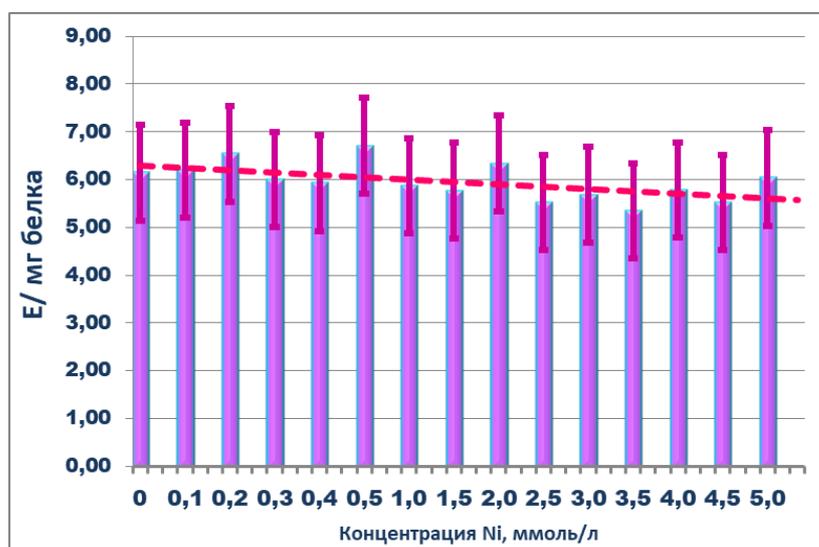


Рисунок 3 – Активность фенантрехинон редуктазы в присутствии ионов никеля

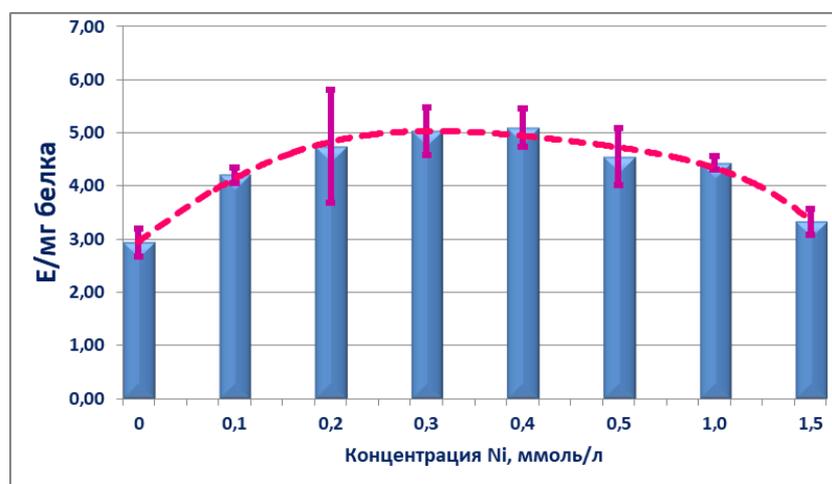


Рисунок 4 – Активность протокатехоат диоксигеназы в присутствии ионов никеля

Анализ взаимодействия *N. phenanthreniclasticum* Rsf11 с присутствующим в среде металлом позволил охарактеризовать внеклеточную адсорбцию и внутриклеточную аккумуляцию никеля бактериями.

Внеклеточная адсорбция являлась преимущественным механизмом детоксикации тяжелых металлов клетками бактерии *N. phenanthreniclasticum* Rsf11. При концентрации никеля 0,1 ммоль/л она составляла 3,218 мг/л; при 0,2 ммоль/л – 3,270 мг/л; при 0,5 ммоль/л – 2,648 мг/л. Внутриклеточная аккумуляция никеля при концентрации 0,1 ммоль/л составляла 0,184 мг/л (12,71 мкг/мг биомассы); при 0,2 ммоль/л – 0,143 мг/л (105,19 мкг/мг); при 0,5 ммоль/л – 0,144 мг/л (75,85 мкг/мг). Никель преимущественно накапливался в слое ЭПС на внешней стороне клеток (рисунок 5).

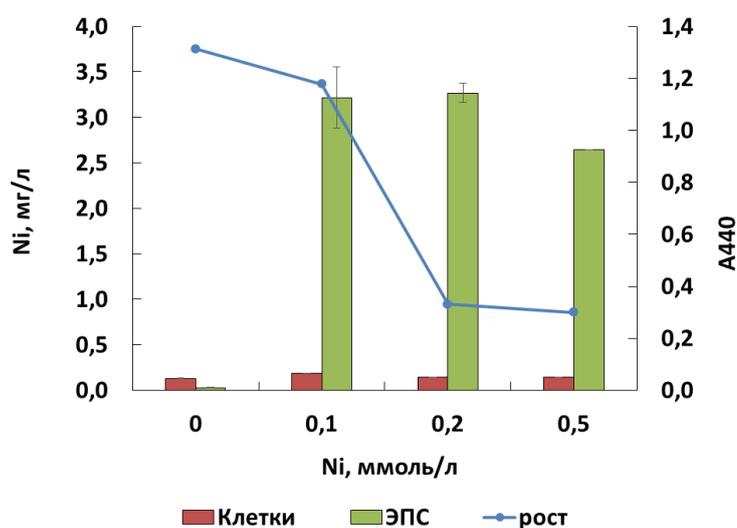


Рисунок 5 – Внутриклеточная аккумуляция и внеклеточная адсорбция никеля клетками *N. phenanthreniclasticum* Rsf11

При этом рост микроорганизмов заметно ингибировался уже при концентрации никеля 0,2 ммоль/л (до 0,33 ед. оптической плотности) и достигал минимума при концентрации 0,5 ммоль/л (0,30 ед. оптической плотности).

Внутриклеточная аккумуляция кадмия при концентрации 0,1 ммоль/л составляла 0,05 мг/л (1,308 мкг/мг); при 0,2 ммоль/л – 0,212 мг/л (2,736 мкг/мг биомассы); при 0,5 ммоль/л – 8,348 мг/л (134,439 мкг/мг). Внеклеточная адсорбция при концентрации 0,1 ммоль/л составляла 7,518 мг/л; при 0,2 ммоль/л – 62,464 мг/л; при 0,5 ммоль/л – 303,484 мг/л. Кадмий также

преимущественно накапливался в слое ЭПС на внешней стороне клеток (рисунок 6).

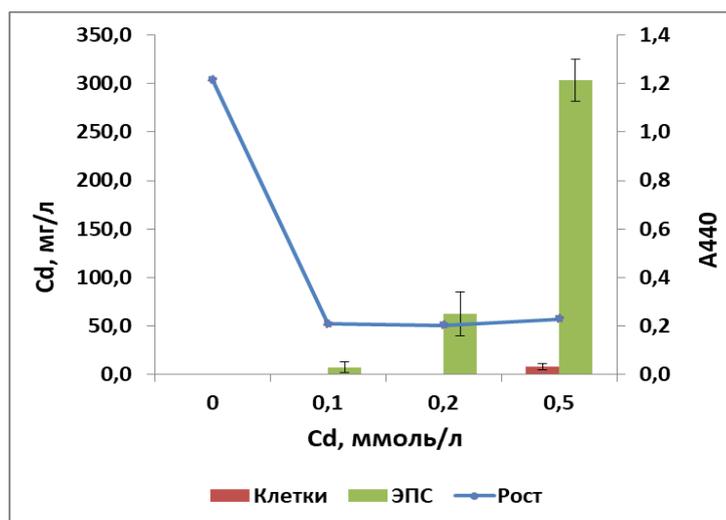


Рисунок 6 – Внутриклеточная аккумуляция и внеклеточная адсорбция кадмия клетками *N. phenanthreniclasticum* Rsf11

Рост микроорганизмов ингибировался, достигая минимума уже при концентрации кадмия 0,1 ммоль/л (до 0,2 ед. оптической плотности) и при дальнейшем повышении концентрации металла не изменялся.

В случае с медью внутриклеточная аккумуляция ее атомов при концентрации 0,1 ммоль/л составляла 0,96мг/л (0,743 мкг/мг); при 0,2 ммоль/л – 1,05 мг/л (0,758 мкг/мг); при 0,5 ммоль/л – 1,06 мг/л (7,244 мкг/мг). Внеклеточная адсорбция при концентрации 0,1 ммоль/л составляла 3,436 мг/л; при 0,2 ммоль/л – 5,336 мг/л; при 0,5 ммоль/л – 1,190 мг/л. Медь при концентрациях 0,1 и 0,2 ммоль/л преимущественно накапливалась в слое ЭПС на внешней стороне клеток, а при концентрации 0,5 ммоль/л – практически в равной степени внутри клеток и на внешней их поверхности (рисунок 7).

Рост микроорганизмов при концентрациях 0,1 ммоль/л и 0,2 ммоль/л ингибировался незначительно, достигая при концентрации 0,1 ммоль/л 0,9 ед. оптической плотности, а при концентрации 0,2 ммоль/л – 0,7 ед. оптической плотности. Минимум роста микроорганизмов соответствовал самой высокой концентрации меди - он достигал 0,1 ед. оптической плотности.

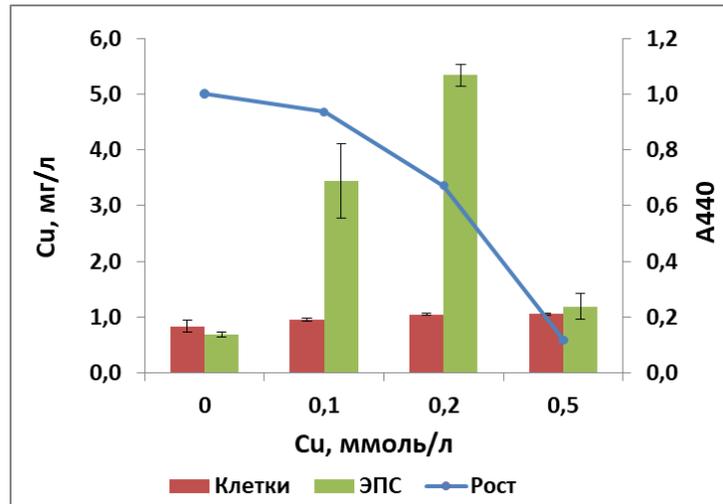


Рисунок 7 – Внутриклеточная аккумуляция и внеклеточная адсорбция меди клетками *N. phenanthreniclasticum* Rsf11

Внутриклеточная аккумуляция цинка при концентрации 0,1 ммоль/л составляла 0,266 мг/л (0,266 мкг/мг); при 0,2 ммоль/л – 0,344 мг/л (0,344 мкг/мг); при 0,5 ммоль/л – 1,477 мг/л (1,477 мкг/мг). Внеклеточная адсорбция при концентрации 0,1 ммоль/л составляла 6,458 мг/л; при 0,2 ммоль/л – 10,128 мг/л; при 0,5 ммоль/л – 23,604 мг/л. Цинк также, как никель и кадмий, преимущественно накапливался в слое ЭПС на внешней стороне клеток (рисунок 8).

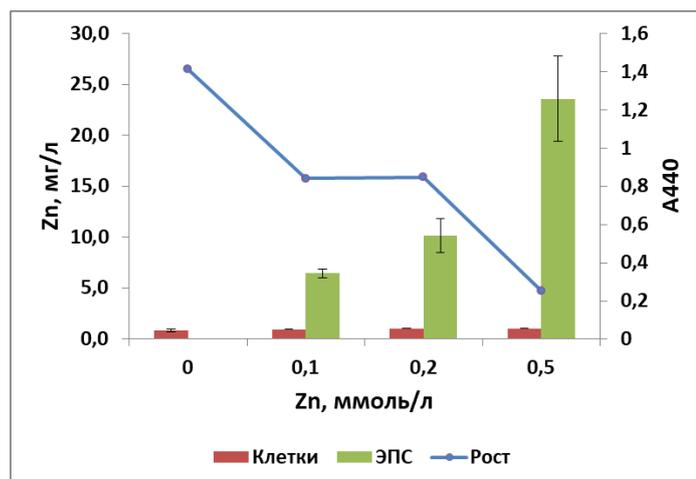


Рисунок 8 – Внутриклеточная аккумуляция и внеклеточная адсорбция цинка клетками *N. phenanthreniclasticum* Rsf11

Рост микроорганизмов ингибировался до 0,84 ед. оптической плотности при концентрации цинка 0,1 ммоль/л, оставаясь таким же и при концентрации 0,2 ммоль/л, и достигал минимума при концентрации 0,5 ммоль/л (0,25 ед. оптической плотности).

Заключение. Проведенное исследование позволило дать количественную и качественную характеристику микробной деградации фенантрена штаммом ризобий *N. phenanthreniclasticum* Rsf11, а также охарактеризовать механизмы устойчивости этого микроорганизма к тяжелым металлам, таким как никель, цинк, медь и кадмий.

Показано влияние ионов тяжелых металлов на рост и микробную деградацию фенантрена штаммом *N. phenanthreniclasticum* Rsf11. На основании полученных данных можно разрабатывать подходы к использованию этой ризобактерии-деструктора в экобиотехнологии очистки экосистем от комплексного загрязнения.

Выводы:

1. Фенантрен в качестве единственного источника углерода и энергии обеспечивал невысокий прирост биомассы штамма *N. phenanthreniclasticum* Rsf11, а в условиях ко-метаболизма с сукцинатом подвергался деградации, которая достигала максимума к 10 суткам культивирования, составляя 58 % от исходного содержания ПАУ в среде и сопровождалась накоплением основного метаболита – 1-гидрокси-2-нафтойной кислоты.

2. У штамма *N. phenanthreniclasticum* Rsf11 были обнаружены ферменты, вовлеченные в деградацию фенантрена – фенантренхинон редуктаза и протокатехоат диоксигеназа. Установлено, что ионы никеля не оказывали существенного влияния на активность фермента фенантренхинон редуктазы, но стимулировали активность протокатехоат диоксигеназы.

3. На основании полученных данных сделано предположение, что основным механизмом устойчивости *N. phenanthreniclasticum* Rsf11 к никелю, цинку, меди и кадмию является внеклеточная адсорбция металла слоем экзополимерных соединений на поверхности клеток. Установлено, что рост микроорганизмов существенно ингибировался, при концентрации Cd 0,1 ммоль/л, при концентрации Ni 0,2 ммоль/л, а при концентрации Zn и Cu – более 0,2 ммоль/л.

A handwritten signature in blue ink, enclosed in a hand-drawn oval. The signature is stylized and appears to consist of several overlapping loops and lines.