

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

Кафедра биохимии и биофизики
Работа выполнена на базе Учебно-научного центра
физико-химической биологии СГУ и ИБФРМ РАН

ДЕГРАДАТИВНЫЕ СВОЙСТВА ГРИБА *FUSARIUM OXYSPORUM*
Schltdl.

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 2 курса 241 группы
Направление подготовки магистратуры 06.04.01 Биология
Биологического факультета
Баландиной Светланы Андреевны

Научные руководители:

доцент СГУ к.б.н. _____



А.А.Галицкая

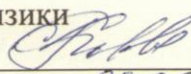
в.н.с. ИБФРМ РАН д.б.н. _____



Н.Н.Позднякова

Заведующий кафедрой биохимии и биофизики

д.б.н., профессор _____



С.А. Коннова

03.06.2019

Саратов 2019

Актуальность

Загрязнение окружающей среды природными и техногенными поллютантами продолжает оставаться серьезной проблемой современности. Природные экосистемы имеют мощный детоксикационный потенциал в виде ферментативной активности микроорганизмов. Одной из многочисленных групп организмов, вносящих серьезный вклад в процессы самоочищения природы, являются высшие грибы, базидио- и аскомицеты.

Основная роль грибов в природе заключается в минерализации органических соединений. Аскомицеты, таксономически являющиеся одним из крупнейших отделов подцарства высших грибов, широко распространены по всему миру. В нем более 30 000 видов, что составляет около 30% всех известных видов грибов. Входящие в этот отдел грибы чрезвычайно разнообразны. Они способны заселять различные экологические ниши, характеризуясь высокой адаптивностью и широким спектром типов взаимоотношений с окружающими организмами – от мутуализма до паразитизма.

Аскомицеты играют важную роль в наземных экосистемах. Разрушая такие субстраты, как растительный опад, мёртвые ветки и стволы деревьев (в том числе входящие в их состав целлюлозу и лигнин, недоступный большинству организмов), они вносят существенный вклад в биологические циклы углерода и азота. Аскомицеты являются основой для многих (до 98%) лишайников. С корневыми системами высших растений многие аскомицеты образуют микоризу.

В силу неоднородности этой группы организмов среди аскомицетов немало видов, обладающих как полезными, так и вредными для человека свойствами, что делает их важными объектами для исследований, а также для использования в современных биотехнологиях. В условиях глобального загрязнения окружающей среды они стали участниками процесса

самоочищения природы от поллютантов, выступая в качестве деструкторов многих загрязнителей.

Одними из представителей этой группы являются грибы рода *Fusarium*, являющиеся разнообразными и вездесущими обитателями природных объектов. В первую очередь, они широко известны как приносящие вред народному хозяйству, вызывающие заболевания и токсикозы у растений и животных. Вид *Fusarium oxysporum* является наиболее часто используемой моделью для исследований взаимодействия растения с патогеном. Вследствие этого наиболее подробно изучены особенности биологии, физиологии, биохимии и экологии паразитических штаммов *Fusarium*, проведены биохимические определения фузариозных микотоксинов, очерчен круг микробов-антагонистов, которые в большей или меньшей степени обладают фунгистатическими или фунгицидными свойствами.

Однако преобладающее число штаммов ведет сапротрофный образ жизни в почве, используя в качестве источников питания лигнин и сложные углеводы и различный мусор. Известны штаммы, образующие взаимовыгодный симбиоз с растениями и даже защищающие их от болезней. Известно участие *Fusarium* в процессах деградации опасных загрязнителей окружающей среды, таких как нефть, синтетические красители, полициклические ароматические углеводороды (ПАУ), гербициды и многие другие. Однако, сведений о механизмах деградации отдельных поллютантов и катализирующих их ферментов все еще недостаточно.

Грибы являются важным компонентом функционирования и саморегулирования экосистем. Они не только активно участвуют в регуляции почвообразовательных процессов, но и играют значимую роль в деградации и детоксикации ксенобиотиков, в том числе труднодоступных для бактерий, таких как полициклические ароматические углеводороды. Наиболее активными деструкторами ПАУ являются грибы, разрушающие в природе лигниновый компонент древесины. Ферментативная система этих грибов,

катализирующая деградацию лигнина, является внеклеточной, неспецифической и окислительной, что позволяет им кроме природного субстрата метаболизировать широкий спектр поллютантов и их смесей, давая определенное преимущество перед бактериями. В результате каталитического действия лигнинолитических ферментов образуются полярные и водорастворимые продукты, которые более доступны как для грибного метаболизма, так и для дальнейшей деградации природной почвенной микробиотой.

Целью данной работы были характеристика деструктивной активности аскомицета *Fusarium oxysporum* Schldl. в отношении распространенных загрязнителей окружающей среды, а также исследование пероксидазы, катализирующей отдельные этапы деградации ПАУ этим грибом.

Задачи исследования включали:

1. Выявление деструктивной активности *F. oxysporum* Schldl. по отношению к полициклическим ароматическим углеводородам, синтетическим красителям ароматического ряда, нефти и неионогенным поверхностно-активным веществам.

2. Изучение способности гриба метаболизировать нефть в качестве единственного источника углерода и энергии, и в присутствии ко субстрата.

3. Исследование метаболических путей деградации отдельных ПАУ (флуорантена и флуорена) *F. oxysporum*.

4. Выявление продукции грибом эмульгирующих веществ в ответ на присутствие в среде культивирования гидрофобных поллютантов.

5. Разработка схемы очистки и изучение каталитических свойств внеклеточной пероксидазы, продуцируемой *F. oxysporum* в ответ на присутствие поллютантов.

В нашем исследовании был взят аскомицет *Fusarium oxysporum*. Основой этому послужили литературные данные о штаммах этого вида, которые образуют взаимовыгодный симбиоз с растениями и участвуют в деградации поллютантов.

Материалы и методы

Исследуемый штамм гриба был выделен нами из пропитанных креозотом шпал. С применением полифазного подхода, сочетающего анализ морфо-физиологических свойств с результатами молекулярно-генетических исследований, гриб был идентифицирован как *Fusarium oxysporum* Schldl.

В первую очередь мы исследовали деградативную активность гриба по отношению к следующим поллютантам: полициклические ароматические углеводороды (ПАУ) (антрацен, фенантрен, флуорен, пирен, флуорантен), неионогенные поверхностно-активные вещества (НПАВ) (неонол АФ9-12), алкилфенолы (изононилфенол), синтетические красители антрахинонового типа (AcidBlue 62 и ReactiveBlue) и нефть. Гриб культивировали в течение 7 сут на качалке при 120 об/мин и 26°C в колбах объемом 250 мл со 100 мл богатой среды для базидиомицетов.

Результаты и обсуждения

Наши эксперименты показали, что для исследуемого гриба хорошо были доступны флуорен, фенантрен и флуорантен деградативная активность составляла от 45% до 23%. При исследовании деградативной активности *F. oxysporum* по отношению к пирену и антрацену (0,05 г/л) показано, что эти два ПАУ были недоступны для гриба, даже при увеличении времени культивирования до 14 сут.

Синтетические красители также представляют собой опасные поллютанты. Они попадают в окружающую среду из стоков лакокрасочной и текстильной промышленности.

Известно, что грибы обесцвечивают красители разрушая хромофорную часть молекулы, и минерализуют целый ряд природных и

синтетических красителей, относящихся к различным химическим группам. Антрахинон занимает центральную часть молекул целого ряда синтетических красителей, так называемого, антрахинонового типа, в связи с чем они проявляют высокую устойчивость к биодegradации.

Обнаружено, что оба исследованных красителя обесцвечивались грибом при этом для грибной атаки были доступны и ароматическая и хромофорная части молекулы.

В качестве представителя неионогенных ПАВ – в нашей работе использовался оксиэтилированный нонилфенол. Группа алкилфенолов, являющаяся продуктами неполной деградации оксиэтилированных нонилфенолов, в нашем исследовании представлена изононилфенолом. Убыль неонла АФ9-12 составляла 30%, при этом деградация затрагивала ароматическое кольцо, тогда как оксиэтильная цепочка оставалась интактной. Изононилфенол был недоступен для гриба.

В результате природных процессов и хозяйственной деятельности человека в окружающую среду попадают сложные смеси поллютантов, в том числе нефть. Для ремедиации почв, загрязненных подобными смесями, широко обсуждается перспектива использования. Нами была исследована способность *F. oxisporum* метаболизировать нефть в условиях погруженного культивирования.

Было обнаружено, что через 14 сут культивирования в присутствии ко-субстрата гриб деградировал до 83,2% нефти при стартовой концентрации 0,5 г/л. Кроме того, выявлено, что нефть может служить для гриба единственным источником углерода и энергии. В этом случае убыль составляла около 20%.

Исследование изменения фракционного состава нефти показало, что в присутствии ко-субстрата утилизация парафиновой и нафтеновой фракций нефти превышало таковую без ко-субстрата 4-10 раз. Тогда как на убыль ароматических фракций наличие ко-субстрата в среде культивирования

влияло незначительно. И, наконец, наименее доступная фракция нефти – смолы активнее утилизировалась в присутствии ко-субстрата.

На следующем этапе нами более подробно была исследована деградация флуорантена и флуорена. Деградация флуорантена достигала 66,7% через 5 сут культивирования и практически не увеличивалась до 14 сут. Присутствие флуорантена в среде культивирования не влияло на рост гриба. Переход на стационарную фазу роста наблюдался уже на 3 сут.

Одним из первых метаболитов деградации флуорантена *F. oxysporum* было соединение, которое по времени удерживания на ВЭЖХ и спектру поглощения было идентифицировано нами как флуорен. Кроме того, обнаружены метаболиты глубокой деградации флуорантена: 9-гидроксифлуорен, 2,2'-дифеновая кислота, 2-карбоксибензальдегид и фталевая кислота. После 8 сут в среде культивирования эти метаболиты не выявлялись. Наличие продуктов «глубокой» деградации ПАУ позволяет предположить в дальнейшем полную утилизацию исходного вещества.

На основании полученных данных нами была предложена следующая схема метаболизма флуорена и флуорантена аскомицетом *F. oxysporum*. Подобный путь метаболизма был ранее обнаружен у базидиомицета *Pleurotus ostreatus* D1. Следует отметить, что полная деградация ПАУ происходила в условиях продукции этим грибом двух внеклеточных ферментов: лакказы и Mn-пероксидазы.

Таким образом проведенное исследование показало схожесть метаболических путей деградации флуорантена у базидио- и аскомицетов, включая образование 9-гидроксифлуорена, 2-карбоксибензальдегида и фталевой кислоты. У *F. oxysporum* ферментом, катализирующим начальную атаку молекулы ПАУ, вероятно является Mn-пероксидаза. Можно предположить, что наличие Mn-пероксидазы является необходимым условием не только для начала деградации ПАУ, но и для утилизации образующихся метаболитов.

Процесс деградации флуорантена и флуорена сопровождался появлением или возрастанием эмульгирующей активности (E_{48}) культуральной среды. Максимальное значение E_{48} отмечено на 5 сут в присутствии флуорантена и 8 сут в присутствии флуорена. По данным литературы у представителя рода *Fusarium* – *F. solani* наличие эмульгирующей активности связывают с продукцией грибом экзополисахарида.

Деградационную активность базидио- и аскомицетов в отношении поллютантов связывают с продукцией ими внеклеточных неспецифических ферментов. Грибы рода *Fusarium* так же, как и лигнинолитические базидиомицеты, продуцируют подобные ферменты (Mn-пероксидазу, лигнин пероксидазу и лакказу), участвующие в реакциях стресса и деградации лигноцеллюлозы. Лакказы грибов рода *Fusarium* хорошо исследованы, их участие в патогенезе подтверждено многочисленными исследованиями, в том числе с помощью функционального анализа лакказных генов. Однако у исследованного нами штамма *F. oxysporum* активности лакказы выявлено не было. В нашем исследовании было показано, что процесс деградации ПАУ сопровождался только продукцией пероксидазы. Использование ряда тестовых субстратов (сирингалдазин, вератриловый спирт) не показало присутствия других лигнинолитических ферментов, таких как лакказа и лигнин пероксидаза. Следует отметить, что пероксидаза обнаруживалась в среде культивирования только в присутствии ПАУ, в контроле (без ПАУ) ее активности выявлено не было. По-видимому, этот фермент является необходимым для деградации ПАУ данным грибом. Для проверки этого предположения проведены очистка и изучение каталитических свойств пероксидазы.

Исследование также включало выделение и частичную характеристику по основным молекулярным и каталитическим свойствам внеклеточный фермент пероксидазу *F. oxysporum*.

Гриб культивировали до достижения максимума продукции пероксидазы (20 Ед/мл), культуральную жидкость и мицелий разделяли фильтрованием. Культуральную жидкость концентрировали в 50 раз ультрафильтрацией (Amicon, PM-10) и использовали как источник фермента. Фермент был очищен ионообменной хроматографией на колонке DEAE-Toyopearl в системе АКТА Start.

Показано, что фермент проявлял каталитическую активность только в присутствии H_2O_2 и окислял фенольные (пирокатехин, гваякол, 2,6-диметоксифенол) и нефенольные (АБТС, 2,7-диаминофлуорен, о-дианизидин) субстраты. Определены оптимумы рН окисления этих субстратов. Сирингалдазин для фермента был недоступен. Обнаружено, что за исключением гваякола, оптимумы рН находятся в кислой области, что является характерным для грибных пероксидаз. Наименьшее значение рН – 2,5 было показано для окисления АБТС.

Пероксидаза окисляла как нативные ПАУ, так и продукт окисления флуорена – 9-флуоренон. Наиболее доступными для пероксидазного окисления оказались флуорантен и флуорен. Пирен окислялся ферментом в незначительной степени, результатом этого может быть незначительная деградация этого ПАУ в культуре гриба. Кроме флуорена, для пероксидазы *Fusarium* был доступен еще один трехциклический ПАУ – фенантрен, тогда как его аналог, антрацен, почти не окислялся. Это может быть связано с меньшей растворимостью антрацена.

Обнаружено, что пероксидаза в значительной степени, в 4,5 раза, стимулировалась Mn^{2+} , тогда как Cu^{2+} ингибировала фермент. Полученные данные позволяют предположить, что пероксидаза *F. oxysporum* по каталитическим свойствам может быть подобной Mn-зависимым пероксидазам лигнинолитических базидиомицетов

Были определены основные каталитические константы для окисления H_2O_2 , фенольного (2,6-диметоксифенол) и нефенольного (АБТС) субстратов

Наибольшим сродством фермент обладал к АБТС, соответственно величина КМ для этого субстрата была самой низкой. Тогда как число оборотов было наибольшим для H_2O_2 .

Структура и объем работы. Работа изложена на 75 страницах, содержит 20 рисунков, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, выводов и списка использованной литературы. Список литературы включает 84 источника.

Выводы:

1. Обнаружено, что почвообитающий аскомицет *Fusarium oxisporum* является активным деструктором широкого спектра поллютантов, включая полициклические ароматические углеводороды, синтетические красители, поверхностно-активные вещества и нефть.
2. *Fusarium oxisporum* может использовать нефть в качестве единственного источника углерода и энергии, при этом наиболее доступными для гриба являются ароматические фракции нефти.
3. Проведенное исследование показало схожесть метаболических путей деградации флуорантена у базидио- и аскомицетов, включая образование 9-гидроксифлуорена, 2-карбоксибензальдегида и фталевой кислоты.
4. Выявлены ферменты, которые катализируют начальную атаку молекулы ПАУ, вероятно является Mn-пероксидаза. Можно предположить, что наличие Mn-пероксидазы является необходимым условием не только для начала деградации ПАУ, но и для утилизации образующихся метаболитов.
5. Обнаружено, что в процессе деградации флуорантена *Fusarium oxysporum* продуцирует пероксидазу, которая по каталитическим свойствам подобна Mn-пероксидазам базидиомицетов. Фермент в присутствии Mn^{2+} и H_2O_2 катализировал

окисление

нативных

ПАУ

(флуорантен,

флуорен,

фенантрен), что подтверждает его участие в начальной атаке этих соединений.

A handwritten signature in blue ink, written in a cursive style, located in the upper right quadrant of the page.