

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

Кафедра микробиологии и физиологии растений

**ВЛИЯНИЕ БЕЛКОВ-АНТИФРИЗОВ, ОКСИДОВ МЕТАЛЛОВ И
БАКТЕРИИ PSEUDOMONAS SYRINGAE НА ПРОЦЕСС ЗАМЕРЗАНИЯ
ВОДЫ.**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студента 4 курса 422 группы
Направления подготовки бакалавриата
06.03.01 Биология
Биологического факультета
Карандина Георгия

Научный руководитель:

профессор, докт. биол. наук



С.А. Степанов

Зав. кафедрой:

профессор, докт. биол. наук



С.А. Степанов

Саратов 2023

ВВЕДЕНИЕ

На нашей планете жидкая вода — чрезвычайно распространенное соединение. Это принципиально важно для всех живущих здесь организмов. Таким образом, превращение жидкой воды в лед имеет серьезные последствия для пораженных организмов, а поскольку условия, благоприятствующие переходу воды в лед, существуют (по крайней мере, иногда) на значительной части земной поверхности, многие живущие здесь организмы должны иметь специальные приспособления для этого случая, включая действие многих биомолекул самой разной химической природы.

Если поместить лёд в воду, жидкая вода и лёд будут сосуществовать достаточно долго, между ними образуется равновесие, которое поддерживает температуру такой смеси около 0°C. Измеряя температуру сосуществования льда и воды, можно оценить количество примесей в воде. Так, известно, что растворение любого низкомолекулярного вещества в концентрации 1 моль понижает температуру сосуществования льда и воды на 1.8°C. В литературе существует некоторая путаница в терминологии и эту температуру, очень часто называют температурой замерзания или температурой плавления льда. Тем не менее в экспериментах температура плавления льда может отличаться от температуры сосуществования льда и воды. Это связано с техническими особенностями проведения эксперимента.

Материалы исследований. Исследования были проведены в 2022 году в группе спектроскопии белка Института белка РАН.

Большинство экспериментов проводились в три этапа. Сначала в пробирку наливали воду, пробирку помещали в установку в которой термостат выполнял несколько раз охлаждение и нагрев образца. При этом, с помощью термометра, непрерывно записывалась температура образца. Затем в воду добавляли предполагаемый нуклеатор (нерастворимое вещество или бактерию *Pseudomonas syringae*) и также проводили циклы охлаждения-нагрева. Далее в образец с водой и нуклеатором добавляли белок-антифриз и снова, выполняли

охлаждение-нагрев. Циклы охлаждения-нагрева повторяли с каждым образцом от 10 до 30 раз, это позволяет получить 10-30 значений температуры замерзания образца. Такое количество данных необходимо, поскольку процесс возникновения зародыша льда это случай процесс, и поэтому температура замерзания отличается от эксперимента к эксперименту.

С помощью программы Sigma Plot строили графики зависимости температуры образца от времени нахождения образца в приборе.

Культивирование *Pseudomonas syringae*. Клетки микроорганизмов отбираем бактериологической петлей, посев делался на твердую среду с составом: 16г триптон, 10г дрожжевого экстракта, 5г NaCl, 15г агар на литр, pH 7,5. Среда находится в чашке Петри, на её поверхности проводятся штрихи, после чего чашка закрывается и помещается в термостат крышкой вниз. В термостате чашка находится 15 часов при температуре 26° С. Далее одна колония из чашки переносится с помощью шпателя в 5 мл жидкой среды LB указанного выше состава и растёт при температуре 26° С в течение ночи. Клетки из 5 мл ночной культуры осаждаются центрифугированием при 7 th g в течение 15 минут. Далее полученный осадок клеток отмывается. Для этого клетки ресуспендируются в 5 мл 10 mM трисHCL, pH 7 и центрифугируются при 7 th g, 15 минут. Отмытые клетки ресуспендируются в 2 мл того же буфера, после измеряется оптическая плотность.

Структура работы. Диплом изложен на 42 страницах и содержит такие структурные элементы: Содержание, Введение, Основная часть, Заключение, Выводы и Список использованных источников. В свою очередь основная часть содержит такие главы:

1. Замерзание воды.
2. Нуклеаторы замерзания воды.
3. Белки-антифризы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Замерзание воды. Известно, что вода замерзает при 0°C . Точнее, 0°C — это температура, при которой лед сосуществует с водой, но это не означает, что при охлаждении вода начинает замерзать при 0°C . Замораживание — это фазовый переход первого рода [1, 2], который может быть чрезвычайно медленным; таким образом, вода может длительное время существовать в виде переохлажденной жидкости при отрицательных температурах, а не замерзает ровно при 0°C .

На рисунке 1 показана зависимость температуры воды в пробирке от времени охлаждения и последующего нагревания — то есть процесс охлаждения, замерзания воды и плавления льда. На рисунке видно, что чистая вода довольно долго (около 4 минут) находится в переохлажденном состоянии. Затем при температуре около -10°C возникает зародыш льда и часть воды замерзает. Это видно по скачку температуры образца, поскольку при замерзании воды (как и при кристаллизации любого вещества) выделяется тепло. Температура в момент начала замерзания обозначена как T_f .

После замерзания части воды в пробирке образуется смесь вода–лед, которая может удерживать температуру около нуля градусов. На кривой показанной на рисунке 1 видим «плато» с 4ой по 7-ю минуту. Температура этого плато, то есть температура смеси вода-лед на рисунке обозначена T_{i-w} . При дальнейшем охлаждении вся вода в пробирке замерзает и образец охлаждается до отрицательных температур. На рисунке 1 это -11°C . После этого образец (лед) нагревали и на рисунке 1 в районе 17-ой минуты виден изгиб кривой который связан с тем, что лед начинает таять и при таянии поглощается энергия, поэтому некоторое время образец удерживает температуру около 0°C . На рисунке температура плавления обозначена T_m .

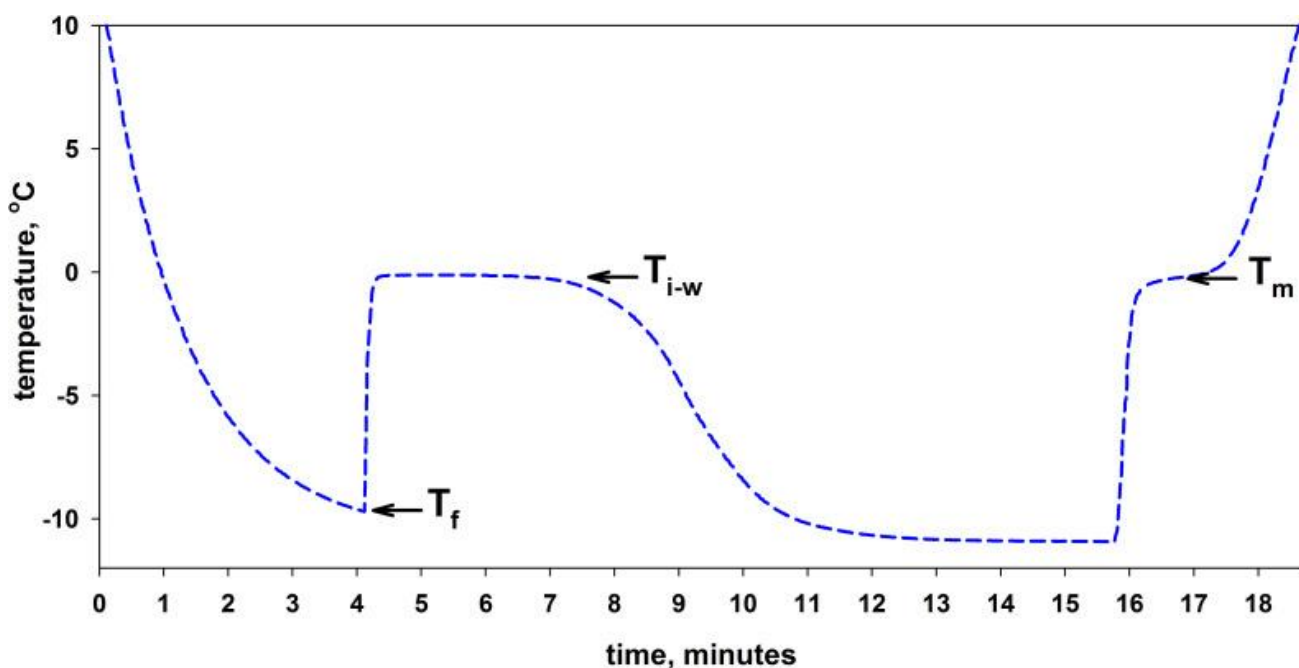


Рисунок 1. Зависимость температуры образца от времени при охлаждении и последующем нагреве. Образец комнатной температуры (mQ – деионизированная вода) выдерживали в термостате при температуре -11°C в течение интервала времени от нуля до 15-й минуты, а затем переносили в термостат, предварительно нагретый до $+25^{\circ}\text{C}$, для дальнейшего контроля начиная с 15-й минуты. Стрелками показаны участки кривой, на которых были определены температура замерзания воды T_f , температура сосуществования льда и воды T_{i-w} и температура плавления льда T_m .

Нуклеаторы замерзания воды.

Нуклеаторы представляют собой катализаторы кристаллизации. При наличии нуклеаторов, вода не может быть в сильно переохлажденном состоянии, то есть замерзает значительно выше температуры -10°C .

AgI - одно из наиболее изученных веществ, способствующих образованию зародышей льда. В то время как очищенная вода замерзает при температуре около 273 К (-36°C), для замораживания чистой воды при более высоких температурах необходимы частицы, образующие зародыши льда. Для частиц AgI, которые полностью погружены в воду, температура замерзания увеличивается с увеличением площади поверхности AgI. Воннегут [3] заметил,

что кусочек йодида серебра способен замораживать жидкую воду при температуре ниже 269 К (-4°C), он приписал эту способность к образованию ледяных зародышей из-за плотного прилегания кристаллических решёток льда и частиц AgI . Но важность соответствия решетки была поставлена под сомнение, поскольку лед, зарождается преимущественно на боковой поверхности йодида серебра [4]. Также известны примеры органических веществ, таких как кристаллические стероиды, которые катализируют кристаллизацию почти так же эффективно, но их кристаллические решётки не образуют связи с кристаллической решёткой льда [10]. Однако благодаря многим исследованиям стало известно, что взаимодействие с кристаллической решёткой льда, по-видимому, является одной из способностей, способствующих зарождению льда, но не единственным. Другими свойствами могут быть низкий поверхностный заряд и большая поляризуемость поверхности, на которой образуется лед. Так же важными свойствами являются ориентация водородных связей и ван-дер-ваальсовы взаимодействия между ледообразующей структурой и молекулами воды.

Также хорошо исследованным нуклеатором является *Pseudomonas syringae*. Эта грамотрицательная бактерия является обычным членом эпифитных сообществ и важным фитопатогеном различных сельскохозяйственных культур [11]. Она способна замораживать переохлажденную воду при температуре выше -10°C [5]. Эта способность нужна бактерии для получения доступа к питательным веществам растений, вызывая серьезные повреждения сельскохозяйственных культур и других видов растительности [13].

Белки-антифризы

Белки-антифризы (AFP) синтезируются различными организмами для выживания при отрицательных температурах и являются важными элементами низкотемпературной адаптации [6]. Они представляют собой структурирующие лед белки, которые контролируют рост и рекристаллизацию

кристаллов льда [7]. Эти белки ограничивают рост льда в течение длительного периода времени, поддерживая температуру между точками таяния и замерзания. AFP независимо развились в различных организмах как средство защиты при экстремально низких температурах, эта конвергентная эволюция привела к большому структурному разнообразию. Антифризные белки наблюдаются у многих организмов, включая микроорганизмы, рыб, насекомых, растения и позвоночных.

В данной работе исследовались антифризные свойства белка, выделенного из *Rhagium inquisitor* (рис. 4). Молекулярная масса данного белка - 12,8 кДа, так же он известен своей высокой активностью [8]. *R. inquisitor* относится к видам, избегающим замерзания, а это означает, что благодаря антифризному белку, AFP полностью предотвращает замерзание жидкостей своего организма [9].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе исследования были обнаружены вещества-нуклеаторы, ранее не описанные в литературе: CuO, AgCl, SiO₂, ZnO, SnO₂.

Так же были проверены другие вещества, TiO, Cr₂O₃, NiO, BaO, Fe₂O₃ не являются нуклеаторами

Были проверены исследованные ранее нуклеаторы льда: бактерия *Pseudomonas syringae* и иодид серебра.

Белок антифриз из *R. Inquisitor* не влияет на температуру замерзания воды в отсутствии нуклеаторов льда.

Белок из *R. Inquisitor* понижает температуру замерзания воды в присутствии нуклеаторов льда, то есть блокирует действие нуклеаторов льда как белковых, так и неорганических.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- [1] Chernov, A.A. *Modern Crystallography III: Crystal Growth*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 1984; Part 1, Chapters 3–6; p. 8.
- [2] Frenkel, J. *Kinetic Theory of Liquids*; Dover Publications: Dover, UK, 1955; Chapters 6 and 7.
- [3] Vonnegut, B.: The nucleation of ice formation by silver iodide, *J. Appl. Phys.* 18, 593–595, doi:10.1063/1.1697813, 1947
- [4] Zettlemoyer, A. C., Tcheurekdjian, N., and Chessick, J. J.: Surface properties of silver iodide, *Nature*, 192, 653, doi:10.1038/192653a0, 1961
- [5] Maki, L. R., Galyan, E. L., Chang-Chien, M. M. & Caldwell, D. R. Ice Nucleation Induced by *Pseudomonas syringae*. *Appl Microbiol* **28**, 456–459 (1974).
- [6] Ewart K.V., Lin Q. Hew C.L. Structure, function and evolution of antifreeze proteins // *Cell. Mol. Life Sci.* 1999. V. 55. P. 271–283.
- [7] A. Lo Giudice, C. Rizzo, Bacteria associated with marine benthic invertebrates from polar environments: unexplored frontiers for biodiscovery? *Diversity* 10 (3) (2018) 80, <https://doi.org/10.3390/d10030080>.
- [8] Graham LA, Liou YC, Walker VK, Davies PL (August 1997). "Hyperactive antifreeze protein from beetles". *Nature*. 388 (6644): 727–8. Bibcode:1997Natur.388..727G. doi:10.1038/41908. PMID 9285581. S2CID 205029622

[9] Kristiansen E, Ramløv H, Hagen L, Pedersen SA, Andersen RA, Zachariassen KE (September 2005). "Isolation and characterization of hemolymph antifreeze proteins from larvae of the longhorn beetle *Rhagium inquisitor*". *Comp Biochem Physiol B*. 142 (1): 90–97.

