

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

Кафедра биохимии и биофизики

**ДЕГРАДАЦИЯ ФЕНОЛЬНЫХ КИСЛОТ ШТАММОМ
ACHROMOBACTER INSOLITUS LCu2**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студента 4 курса 421 группы

Направления подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология


Биологического факультета

Морозовой Евы Сергеевны


Научный руководитель,
доцент,
канд. биол. наук:

30.05.2023  Е.С. Тучина
дата, подпись

Научный консультант,
м.н.с. лаборатории
экологической биотехнологии,
ИБФРМ РАН:

 Е.В. Крючкова
дата, подпись 30.05.2023

Зав. кафедрой,
профессор,
д-р биол. наук:

 С.А. Коннова
дата, подпись
30.05.2023

Саратов, 2023

ВВЕДЕНИЕ

Фенольные кислоты (ФК) соединения, синтезируемые растениями, с химической структурой С6-С3. ФК являются продуктами распада полимеров клеточной стенки растений [1], интермедиатами деградации ароматических ксенобиотиков [18], выполняют защитные и сигнальные функции в растениях [4]. ФК являются стойкими к разложению компонентами, однако некоторые почвенные бактерии способны утилизировать их в качестве источника углерода [5, 6, 7], или использовать как доноров электронов в процессах азотфиксации [8]. Поиск ризосферных бактерий, трансформирующих и деградирующих ФК, представляет собой практический и фундаментальный интерес.

Цель данной работы – исследовать деструктивный потенциал ризосферного штамма *Achromobacter insolitus* LCu2 по отношению к коричной кислоте и её производным.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Исследовать жизнеспособность и особенности роста *A. insolitus* LCu2 на среде с коричной кислотой и её производными в качестве единственного источника углерода.
2. Получить адаптированную к коричной кислоте культуру *A. insolitus* LCu2a, провести сравнительный анализ ростовых характеристик исходной и адаптированной культур.
3. Определить трансформацию и убыль коричной кислоты из среды культивирования, рассчитать деструктивную активность *A. insolitus* LCu2a.
4. Оценить фитотоксичность бактериальных супернатантов в отношении проростков пшеницы *Triticum aestivum* L. сорта Саратовская 29.
5. Осуществить поиск генов, кодирующих ферменты деградации коричной кислоты, в геноме *A. insolitus* LCu2.
6. Составить предполагаемый биохимический путь деградации коричной кислоты штаммом *A. insolitus* LCu2.

Объект исследования. Штамм *Acromobacter insolitus* LCu2, предоставлен коллекцией ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН (IBPRM 631). Геном (CP038034) секвенирован на базе Казанского университета и депонирован в базе данных NCBI.

Среда и условия культивирования. Бактерии выращивали на жидкой среде MS1[41]. В качестве источника фосфора использовали K_2HPO_4 – 0,5 г/л. Фенольные кислоты (0,5 – 1,0 г/л) использовали в качестве единственного источника углерода. Жизнеспособность бактериальных культур оценивали, высевая колониеобразующие единицы (КОЕ) из серии разведений с 10^{-1} до 10^{-7} на среды MS1 с коричной кислотой (0,5 и 1 г/л) и LB.

Получение адаптированной к коричной кислоте культуры *A. insolitus* LCu2a. Культуру *A. insolitus* LCu2a получали путём многократных пересевов на среду с коричной кислотой.

Определение ростовых характеристик и деструктивной активности бактерий. Рост контролировали по изменению оптической плотности (ОП) при 420 или 660 нм. Ростовые параметры и деструктивную активность рассчитывали по стандартным формулам [42, 41].

УФ-спектрометрия фенольных кислот. Бактериальные суспензии осаждали центрифугированием ($5000g \times 5$ мин), надосадочную жидкость разводили 1:10. Спектры измерялись на спектрофотометре Analytic Jena (Германия) в диапазоне от 200 до 400 нм.

Анализ коричной кислоты методом ВЭЖХ. Остаточное содержание коричной кислоты в бактериальных супернатантах определяли методом ВЭЖХ на хроматографе Dionex UltiMate 3000 с C18 колонкой и УФ-детектором, при 240 нм [6]. Коричную кислоту из образцов экстрагировали трижды этилацетатом в пропорции 1:1 (200 мкл надосадка к 200 мкл этилацетата). Объединённые экстракты упаривали и использовали для анализа.

Поиск генов деградации коричной кислоты в геноме *A. insolitus* LCu2. Аминокислотные последовательности белков запроса были экстрагированы из Uniprot [44] и использованы для поиска гомологов в геноме LCu2 с

использованием BLASTP с алгоритмом (protein-protein BLAST) [45]. Порог отсечения был следующим (покрытие>80%; E-value<10⁻¹¹; идентичность>20%).

Реконструкция метаболического пути деградации коричной кислоты у *A. insolitus* LCu2. Анализируя геномное окружение генов, ответственных за гидроксирование бензольного кольца коричной кислоты, строили предположительный биохимический путь деградации коричной кислоты *A. insolitus* LCu2. Для предсказания использовали биохимические реакции и пути из Киотской энциклопедии генов и геномов [43].

Оценка фитотоксичности бактериальных супернатантов. Зерновки мягкой яровой пшеницы *Triticum aestivum* L. сорта «Саратовская 29» калибровали, стерилизовали 0,2% диацидом и проращивали в чашках Петри на фильтровальной бумаге, смоченной средой Мурасиги-Скуга с добавлением бактериальных супернатантов (3:2). Измерение длины корня и стебля у проростков производилось на 3 и 5 сутки роста.

Статистический анализ данных Для экспериментальных данных рассчитывали доверительный интервал со степенью достоверности ($p \leq 0,05$) в Microsoft Excel 2010.

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 47 источников. Работа изложена на 45 страницах машинописного текста. Работа проиллюстрирована 12 рисунками и 4 таблицами.

Научная новизна и значимость работы. Проведённые исследования выявили способность штамма *A. insolitus* LCu2 расти на коричной кислоте и ее производных, сохраняя жизнеспособность длительное время, и эффективно деградировать коричную кислоту. Для штамма *A. insolitus* LCu2 подобраны оптимальные условия культивирования. Найдены гены, кодирующие ферментный комплекс, отвечающий за гидроксирование кольца коричной кислоты. Реконструирован предположительный биохимический путь

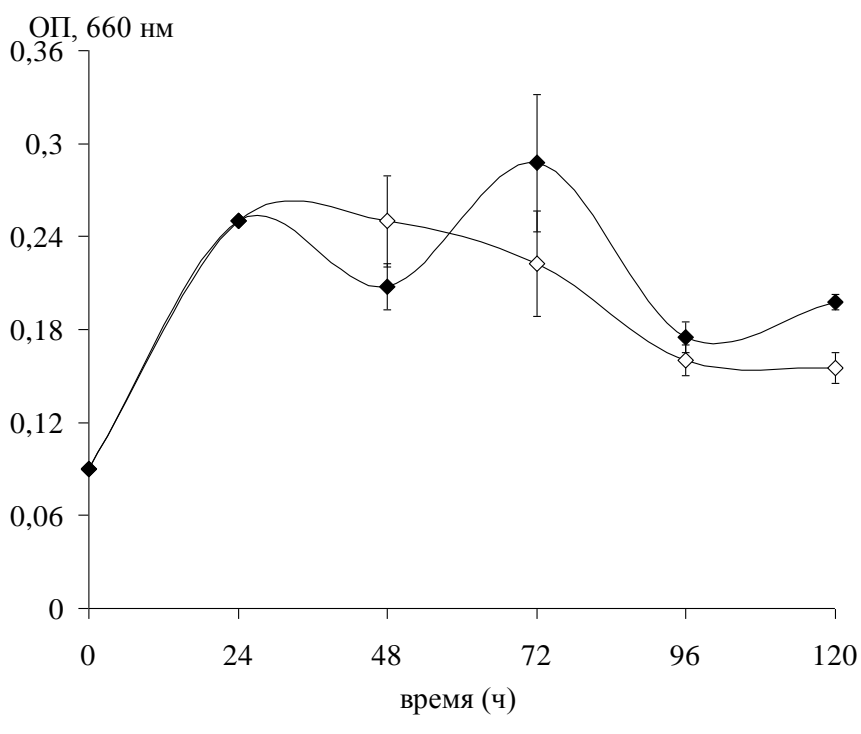
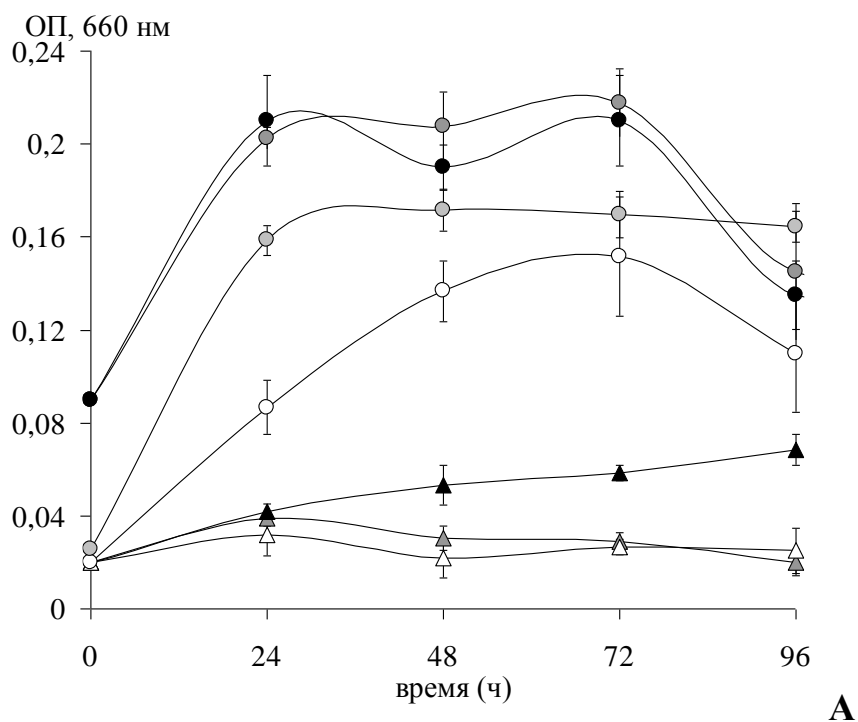
деградации. Полученные данные могут быть использованы для подбора условий дальнейших биохимических экспериментов, для оптимизации деструктивной активности бактерий по отношению к ФК, демонстрируют способность штамма *A. insolitus* LCu2 к взаимодействию с растениями. Штамм *A. insolitus* LCu2 может быть использован для оздоровления почвы от аллелохимических токсичных компонентов.

Основное содержание работы.

Рост *A. insolitus* LCu2 на различных ФК. К соединениям, поддерживающим рост *A. insolitus* LCu2, относились: коричная, феруловая, ванилиновая, кофейная кислоты (рисунок 1). На накопление биомассы влияли плотность засева и в меньшей степени концентрация источника углерода. Бактериальные культуры с начальной плотностью 0,02 увеличивали ростовые показатели, в частности ОП_{660нм}, в 7,5 на 0,5 г/л коричной кислоты и в 8,5 раз на 1 г/л (белые и светло-серые маркеры). Ростовые характеристики в вариантах с плотностью засева 0,09 на обеих концентрациях увеличивались только в 2,5 раза (чёрные и тёмно-серые маркеры). На замещённой м-кумаровой кислоте наблюдался слабый рост, и отсутствие роста на о- и р-кумаровых кислотах в течение 96-ти часов культивирования (рисунок 1-А треугольные маркеры).

Таблица 1 – Скорость роста и время генерации бактериальных культур *A. insolitus* LCu2, выращенных на средах с различными ФК

Источник углерода, (г/л)	Плотность засева	Скорость роста, (ч ⁻¹)	Время генерации, (ч)
Коричная кислота, 0,5	0,02	0,041	16,9
Коричная кислота, 1	0,02	0,045	15,4
Коричная кислота, 0,5	0,09	0,034	20,4
Коричная кислота, 1	0,09	0,035	19,8
м-кумаровая кислота, 0,5	0,02	0,020	34,6
о-кумаровая кислота, 0,5	0,02	0	0
р-кумаровая кислота, 0,5	0,02	0	0
Феруловая кислота, 0,5	0,09	0,043	16,1
Ванилиновая кислота, 0,5	0,09	0,043	16,1



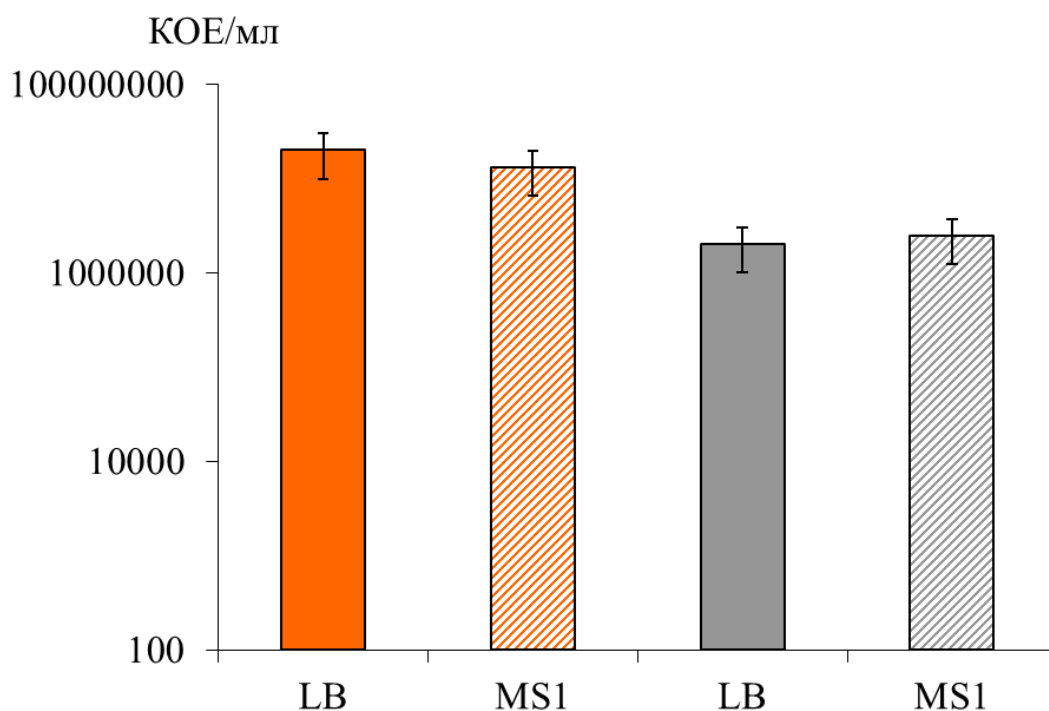
А – круглые маркеры–коричная кислота: белые (0,5 г/л) начальная плотность засева 0,02; серые (0,5 г/л) начальная плотность засева 0,09; светло-серые (1 г/л) начальная плотность засева 0,02; чёрные (1 г/л) начальная плотность засева 0,09; треугольные маркеры–производные коричной кислоты: белые–п–кумаровая, серые–о–кумаровая, чёрные–м–кумаровая кислоты; Б – чёрные ромбы–феруловая кислота, белые ромбы–ванилиновая; бары представлены доверительным интервалом для степени достоверности ($p \leq 0,05$);

Рисунок 1 – Рост *A. insolitus* LCu2 на различных фенольных кислотах

На феруловой и ванилиновой кислотах зафиксировано увеличение ОП_{660нм} примерно в три раза. Скорость роста на коричной кислоте у культур с плотностью засева 0,02 была также несколько выше, чем у культур с плотностью 0,09 (таблица 1), а время генерации соответственно уменьшалось.

Жизнеспособность бактерий, культивируемых длительное время на коричной кислоте. Жизнеспособность культур, после длительного пассажа на коричной кислоте сохранялась. Значения колониобразующих единиц (КОЕ) статистически достоверно не отличались друг от друга на обоих типах сред (MS1 и LB), но КОЕ культур, высеянных из среды с коричной кислотой (0,5 г/л), было на один порядок выше, чем у культур из среды с концентрацией (1 г/л) (рисунок 2).

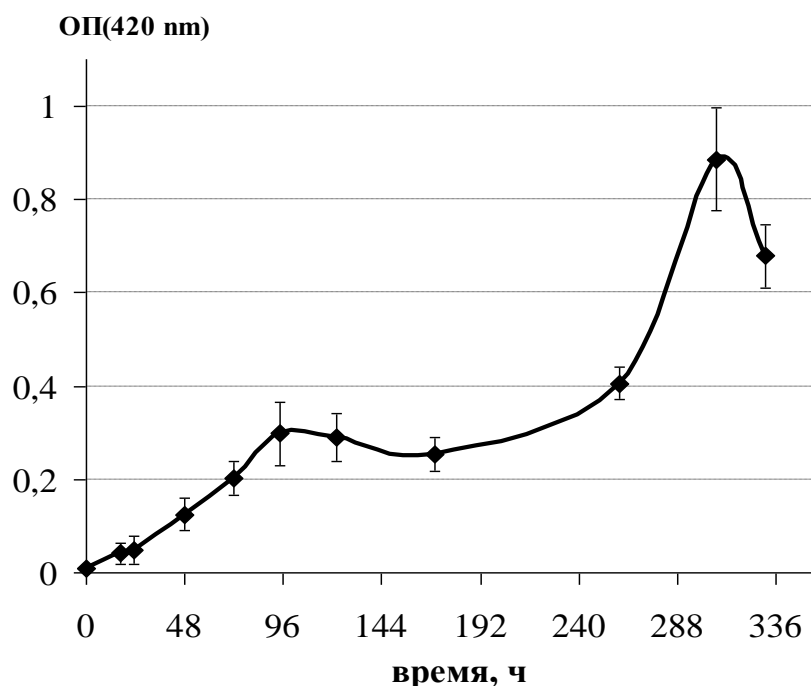
Таким образом, *A. insolitus* LCu2 сохранял жизнеспособность во время длительных пассажей на коричной кислоте, что свидетельствует об его устойчивости.



оранжевый – суспензии, культивируемые на 0,5 г/л коричной кислоты; серый – суспензии, культивируемые на 1 г/л коричной кислоты; бары представлены доверительным интервалом для ($p \leq 0,05$)

Рисунок 2 – Значения колониобразующих единиц бактериальных культур *A. insolitus* LCu2, после 14-ти дневного пассажа на коричной кислоте

Получение адаптированной к коричной кислоте культуры *A. insolitus* LCu2a. Рост культуры *A. insolitus* LCu2a не был сбалансированным, кривая роста имела два пика. Первый стационар зарегистрирован через 96 ч, второй через 307 ч. Скорость роста для обоих пиков была одинаковой и составила $0,017 - 0,018 \text{ ч}^{-1}$, а время генерации $38,5-41,0 \text{ ч}^{-1}$ соответственно (рисунок 3). Подобный рост может быть связан с образованием интермедиата коричной кислоты, используемого бактериями для дальнейшего роста.



бары представлены доверительным интервалом для степени достоверности ($p \leq 0,05$)

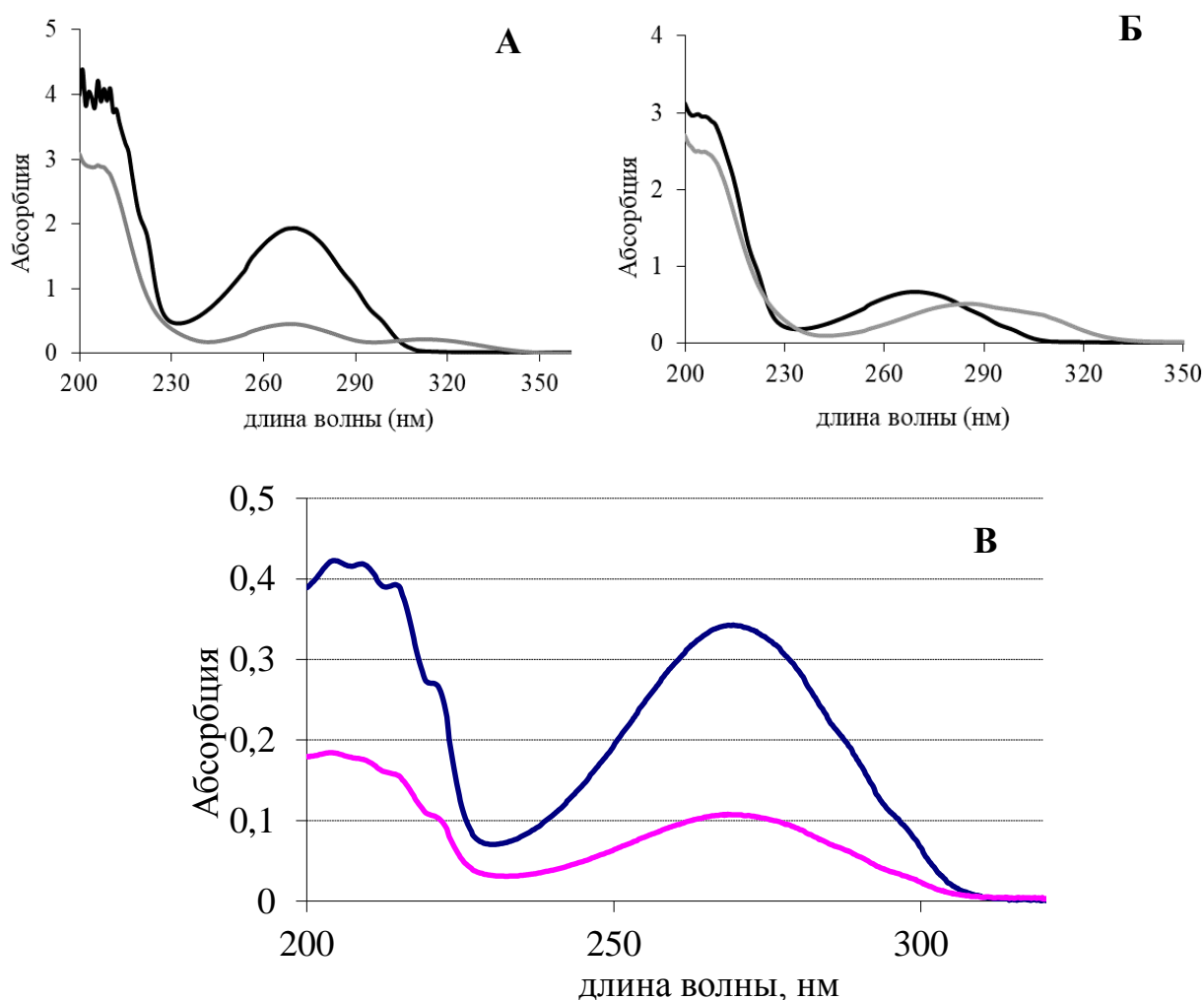
Рисунок 3 – Двухфазная кривая роста адаптированной культуры *A. insolitus* LCu2a на коричной кислоте (0,5 г/л)

Таким образом, адаптированная культура *A. insolitus* LCu2a росла медленнее, чем исходная. Однако прирост биомассы был выше. Максимальное значение ОП_{420нм} было 0,9, что в 2,3 раза превышало максимальное значение ОП у LCu2. Прирост сырой биомассы составил 9 мг/мл.

Убыль и трансформация коричной кислоты. Трансформацию коричной кислоты в процессе бактериального роста оценивали, измеряя УФ-спектры

бактериальных супернатантов (рисунок 4). УФ-спектр коричной кислоты в химическом контроле имел две полосы поглощения (таблица 2).

После бактериального роста максимум второй полосы поглощения смещался к 285 нм (рисунок 7 Б–серый). Значения абсорбции первой полосы поглощения тоже изменялись, оставалось два максимума $\lambda_{\max 1}$ 201 (206). Кроме того появлялся еще один пик в районе 312 нм. Также происходило снижение интенсивности поглощения в 4 раза для 1 г/л и в 1,5 раза для 0,5 г/л (рисунок 4 А, Б–серый), что вероятнее всего вызвано уменьшением концентрации коричной кислоты в среде культивирования.



А–коричная кислота 1,0 г/л; Б–коричная кислота 0,5 г/л; чёрный–химический контроль; серый – после культивирования *A. insolitus* LCu2; В – коричная кислота 0,5 г/л; синий – химический контроль, красный – после культивирования *A. insolitus* LCu2a

Рисунок 4 – УФ спектры MS1 с коричной кислотой до и после

культивирования *A. insolitus* LCu2

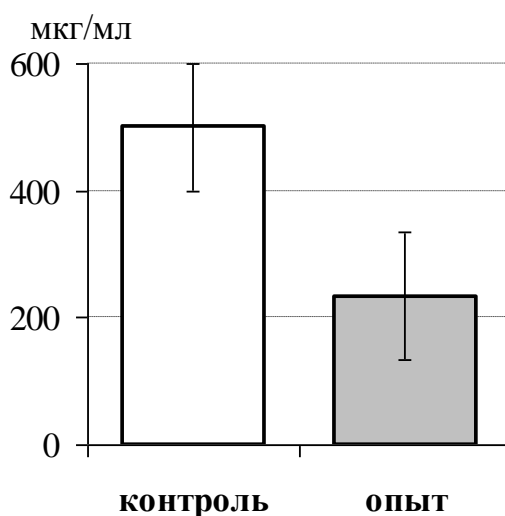
В эксперименте с адаптированной культурой *A. insolitus* LCu2a максимумы поглощения изменялись только в районе первой полосы. Интенсивность поглощения снижалась в 3 раза или на 69 %.

Методом ВЭЖХ анализа, была зафиксирована 53% (266 мкг/мг) по сравнению с химическим контролем (рисунок 8) убыль коричной кислоты после культивирования *A. insolitus* LCu2a. Эффективность деградации (Q) составила 30 мкг/мг для LCu2a и была рассчитана как отношение потреблённой коричной кислоты к сырой биомассе.

Таблица 2 – Максимумы поглощения УФ спектров коричной кислоты до и после культивирования *A. insolitus* LCu2 и LCu2a

Соединение	λ max ₁ (нм)	λ max ₂ (нм)	λ max ₃ (нм)
Опыт 1 Коричная кислота (химический контроль)	201*, 203, 206, 208, 210	270	–
Коричная кислота (0,5 г/л) после <i>A. insolitus</i> LCu2	201, 206	285	309
Коричная кислота (1 г/л) после <i>A. insolitus</i> LCu2	200, 206	270	312
Опыт 2 Коричная кислота (химический контроль)	205*, 209, 215, 222	269	–
Коричная кислота после <i>A. insolitus</i> LCu2a	204	269	–

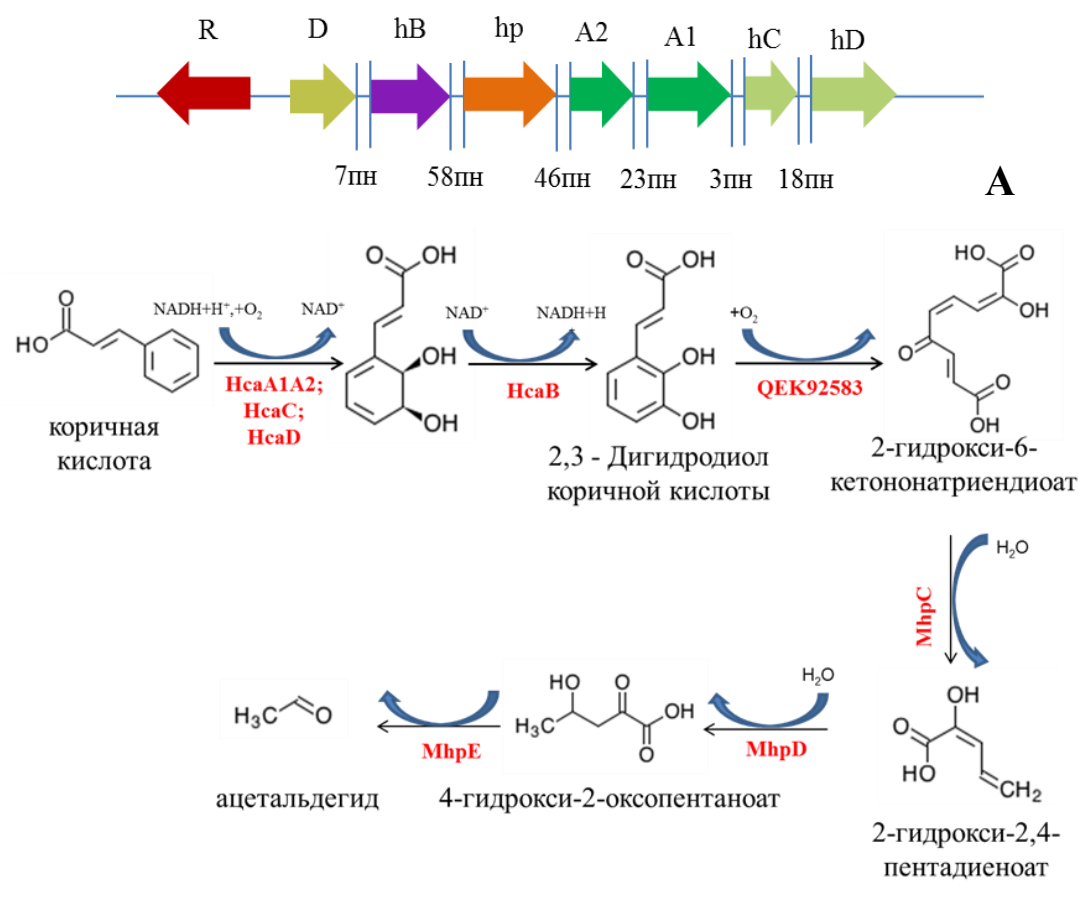
Примечание – * обозначает самый высокий пик поглощения



Бары представлены доверительным интервалом для степени достоверности ($p \leq 0,05$)

Рисунок 5 – ВЭЖХ-анализ коричной кислоты в среде культивирования после роста бактерий (мкг/мл)

Биоинформатический поиск генов, кодирующих ферменты катаболизма коричной кислоты. В геноме *A. insolitus* LCu2 найдены гены, кодирующие ферментный комплекс, отвечающий за дигидроксилирование бензольного кольца. Он состоял из: *hcaA1A2* двух субъединицы (α и β) Риске диоксигеназы; *hcaC* - ферредоксина и *hcaD*- ферредоксин редуктазы. Рядом располагался ген *hcaB*, продуцирующий дегидрогеназу, завершающую образование дигидродиола коричной кислоты. Расщепление кольца, скорее всего, осуществляется белком (QE92583), несущем на N-конце купинозный домен, расщепляющий бензольное кольцо в положении 1,2. Гены дальнейшего метаболизма (*mhpCDE*) также были идентифицированы. Структурная организация генных кластеров, кодирующих ферменты деградации коричной кислоты у *A. insolitus* LCu2, представлена на рисунке 6.

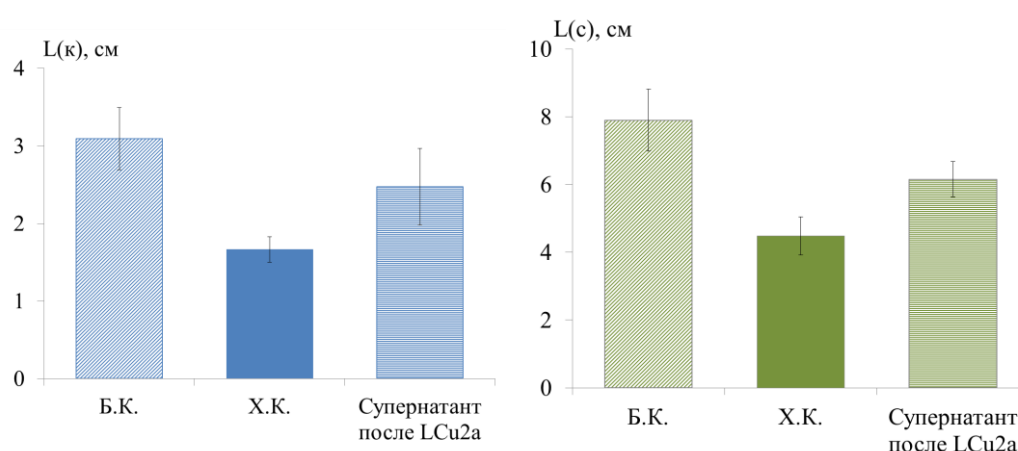


R – *gntR*; D – *mhpD*; hB – *hcaB*; hp – QE92583; A2 – *hcaA2*; A1 – *hcaA1*; hC – *hcaC*; hD – *hcaD*;

GntR–транскрипционный регулятор; **MhpD**–2-кето-4-пентаноат гидратаза; **HcaB**–2,3-дигидрокси-2,3-дигидрофенилпропионат дегидрогеназа; **HcaA1A2**–транс-циннамат диоксигеназа α и β ; **HcaC**–ферредоксин; **HcaD**–ферредоксин редуктаза

Рисунок 6 – Структурная организация генных кластеров (*hca*) и (*mhp*), кодирующих ферменты деградации коричной кислоты (А), путь деградации коричной кислоты штаммом *A. insolitus* LCu2 (Б)

Фитотоксичность бактериальных супернатантов. Токсическое влияние бактериальных супернатантов на пшеницу определяли, сравнивая между собой: 1. биологический контроль (среда для растений); 2. химический контроль (MS1 с коричной кислотой); 3. MS1 с коричной кислотой после культивирования *A. insolitus* LCu2a. У проростков, выращенных на чашках с химическим контролем, длина корня (Lк) ингибировалась на 46%, а длина стебля (Lс) на 43%. После культивирования бактерий фитотоксичность среды значительно снижалась. Процент ингибирования составил всего 20% для корней и 22% для стеблей, по отношению к биологическому контролю. По сравнению с химическим контролем L(к) была больше на 33%, а L(с) на 27%.



синий - средняя длина корня L(k), зеленый - средняя длина стебля L(c); Б.К. - биологический контроль; Х.К. - химический контроль; бары представлены доверительным интервалом для ($p \leq 0,05$); ($n=30 \pm 5$); возраст растений 5 суток; концентрация в чашке коричной кислоты 1 мг

Рисунок 7 – Фитотоксичность супернатантов с коричной кислотой по отношению к растениям мягкой яровой пшеницы «Саратовская 29»



А

Б

А – биологический контроль, Б - среда с супернатантом после культивирования *A. insolitus* LCu2a

Рисунок 8 – Влияние *A. insolitus* LCu2a на формирование корневых волосков у проростков мягкой яровой пшеницы «Саратовская 29»

Таким образом, коричная кислота даже в концентрации 0,1 мг/мл оказывала ингибирующее действие на длину корней и стеблей у пшеницы (рисунок 7). Исследуемый штамм *A. insolitus* LCu2a нивелировал токсическое влияние коричной кислоты и стимулировал образование корневых волосков (рисунок 8).

Заключение

1. Штамм *A. insolitus* LCu2 был способен к росту на коричной кислоте и её производных – феруловой и ванилиновой кислотах, используя их в качестве единственного источника углерода. Концентрация коричной кислоты 0,5 г/л и начальная плотность засева 0,02 были оптимальными для роста LCu2. Штамм длительное время сохранял жизнеспособность в среде с коричной кислотой.
2. Получена адаптированная культура *A. insolitus* LCu2a, способная давать большой прирост биомассы и деградировать коричную кислоту.
3. Рост *A. insolitus* LCu2a коррелировал с 53% убылью коричной кислоты из среды культивирования. Деструктивная активность *A. insolitus* LCu2a составила 30 мкг/ мг сырой биомассы. Изменения максимумов поглощения UV-спектра супернатантов с коричной кислотой, свидетельствовали о трансформации ее молекулы.
4. Коричная кислота в концентрации 0,1 мг/мл ингибировала длину корней и стеблей у проростков пшеницы на 46-43% соответственно. После культивирования *A. insolitus* LCu2a происходило статистически достоверное снижение фитотоксичности. Процент ингибирования составил 20% для корней и 22% для стеблей соответственно.
5. Геном *A. insolitus* LCu2 содержал кластер генов, кодирующих (*hcaA1A2CD*) ферментный комплекс, отвечающий за дигидроксилирование бензольного кольца в положении 2-, 3- и другие гены, обеспечивающие дальнейшее разложение коричной кислоты.
6. Предположительный биохимический путь деградации сконструирован.