

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

Кафедра биохимии и биофизики

**УСТОЙЧИВОСТЬ БАКТЕРИИ *ENSIFER MELILOTI* P221 К ТЯЖЕЛЫМ
МЕТАЛЛАМ**

Автореферат бакалаврской работы

Студентки 4 курса 421 группы

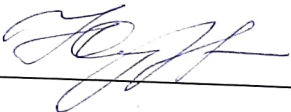
Направления подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология

Биологического факультета

Зрячевой Софьи Сергеевны

Научный руководитель:

доцент кафедры биохимии
и биофизики, к.б.н., доц.



Ю.П.Федоненко


Научный консультант:

заведующая лабораторией экологической биотехнологии
ИБФРМ РАН, д.б.н., доц.



А.Ю. Муратова

Зав.кафедрой биохимии и
биофизики д.б.н., проф.



С.А. Коннова

30.05.2024

Саратов 2024

Введение. Загрязнение почвы тяжелыми металлами является серьезной экологической проблемой, оказывающей негативное влияние на здоровье человека и животных. Загрязнение такими металлами, как цинк и кадмий достаточно распространено в городах с развитой промышленностью, при этом следует отметить, что оба металла относят к первому классу опасности. Помимо этого, часто загрязнение почв тяжелыми металлами сопровождается загрязнением полициклическими ароматическими углеводородами (ПАУ). Комплексные загрязнения такого типа обнаруживаются в пределах индустриальной местности, а также в местах добычи нефти.

Повсеместное распространение металлов в окружающей среде привело к появлению множества систем устойчивости к металлам у микроорганизмов, включающим физико-химические взаимодействия, механизмы эффлюкса, внутриклеточное накопление, связывание и/или внеклеточное осаждение. Одним из проявлений таких механизмов устойчивости является синтез экзополисахаридов (ЭПС), способных связывать катионы тяжелых металлов. Взаимодействие между ЭПС, синтезируемыми почвенными бактериями, и катионами тяжелых металлов имеет важное экологическое и практическое значение, поскольку оно может быть полезно для удаления данных токсикантов из почв. Хотя выработка ЭПС в ответ на воздействие тяжелых металлов изучалась у различных видов бактерий, исследования на ризобиях довольно малочисленны.

Целью данной работы являлась характеристика роста культуры бактерий *Ensifer meliloti* P221 и продукция ими экзополисахаридов (ЭПС) в присутствии солей тяжелых металлов и фенантрена.

Для выполнения поставленной цели были определены следующие задачи:

1. охарактеризовать рост *E. meliloti* P221 на различных средах и определить оптимальную для продукции ЭПС среду культивирования;
2. определить продукцию биомассы и ЭПС при культивировании *E. meliloti* P221 в минеральной среде в присутствии различных концентраций солей тяжелых металлов, фенантрена и комплексного загрязнения;

3. оценить деградацию фенантрена штаммом *E. meliloti* 221 в присутствии различных концентраций солей металлов;
4. определить возможные механизмы устойчивости *E. meliloti* P221 к катионам цинка и кадмия.

Основное содержание работы. Объектом исследования являлись бактерии *Ensifer meliloti* P221 (IBPPM 383), способные к разложению ПАУ и стимуляции роста растений, любезно предоставленные коллекцией ризосферных бактерий ИБФРМ РАН (г. Саратов). Для рутинного культивирования ризобий использовали твердую питательную среду R2A с добавлением фенантрена в концентрации 2 г/л.

Для сравнительного анализа продукции ЭПС исследуемый штамм культивировали на средах S, R2A, MSM с различными источниками углерода. Для оценки влияния ПАУ на продукцию ЭПС штаммом *E. meliloti* P221 культивирование проводили на среде MSM с добавлением фенантрена в различных концентрациях: 0; 0,1; 0,2; 0,4 г/л. При определении продукции ЭПС штаммом *E. meliloti* P221 в присутствии катионов тяжелых металлов выращивание осуществляли в среде MSM с различными концентрациями цинка и кадмия (0; 0,01; 0,05; 0,1 ммоль/л). Для оценки влияния комплексного загрязнения (тяжелых металлов и ПАУ) на продукцию ЭПС штаммом *E. meliloti* P221 были проведены эксперименты в присутствии 0,2 г/л фенантрена с различными концентрациями цинка и кадмия: 0; 0,1; 0,2; 0,5 ммоль/л. Культивирование бактерий осуществляли при встряхивании в термостатируемых условиях (29°C, 130 об/мин).

Во всех экспериментальных вариантах оценивали выход биомассы и продукцию ЭПС. Биомассу осаждали на центрифуге, полученный осадок далее промывали ацетоном и высушивали до постоянной массы (60°C, 24 часа). ЭПС выделяли из культуральной жидкости, полученной в результате центрифугирования, к которой добавляли два объема охлажденного 96%-ного этанола. Смесь выдерживали в холодильнике (-18°C, 24 часа). Далее образцы

центрифугировали (10000 об/мин, 30 мин), осадок высушивали на воздухе и взвешивали.

Содержание Zn и Cd в биомассе бактерий определяли методом атомно-абсорбционной спектроскопии по стандартной методике с помощью атомно-абсорбционного спектрометра Thermo Scientific iCE 3500.

Исследование способности к деградации ПАУ у штамма *E. meliloti* P221 проводили с использованием фенантрена. Концентрацию метаболитов фенантрена определяли после экстракции этилацетатом методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на хроматографе Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 (США) с диодно-матричным детектором (DAD) при 252 нм и на хроматографе Acclaim® 300 шириной колонка с порами (300 Å). Изократическое элюирование осуществлялось со скоростью 0,5 мл/мин, при 30°C. Деградацию фенантрена выражали в процентах снижения их исходной концентрации.

В результате эксперимента, целью которого было нахождение оптимальной для продукции ЭПС среды, было установлено, что самая высокая продукция ЭПС наблюдалась при культивировании на минеральной среде MSM, характеризующейся низким содержанием азота (рисунок 1).

Для дальнейшего изучения продукции ЭПС была выбрана среда MSM. Параллельно с этим, осуществлялся контроль на наличие углеводов во внеклеточном полимерном веществе фенол-сернокислотным методом. К середине эксперимента (3 сутки культивирования) продукция ЭПС при культивировании на среде MSM была в 6,6 раз больше, чем при культивировании на среде S и в 2,4 раз больше, чем при культивировании на среде R2A. К концу эксперимента (на 7 сутки культивирования), продукция ЭПС при культивировании на среде MSM была в 6,4 раз больше, чем при культивировании на среде R2A.

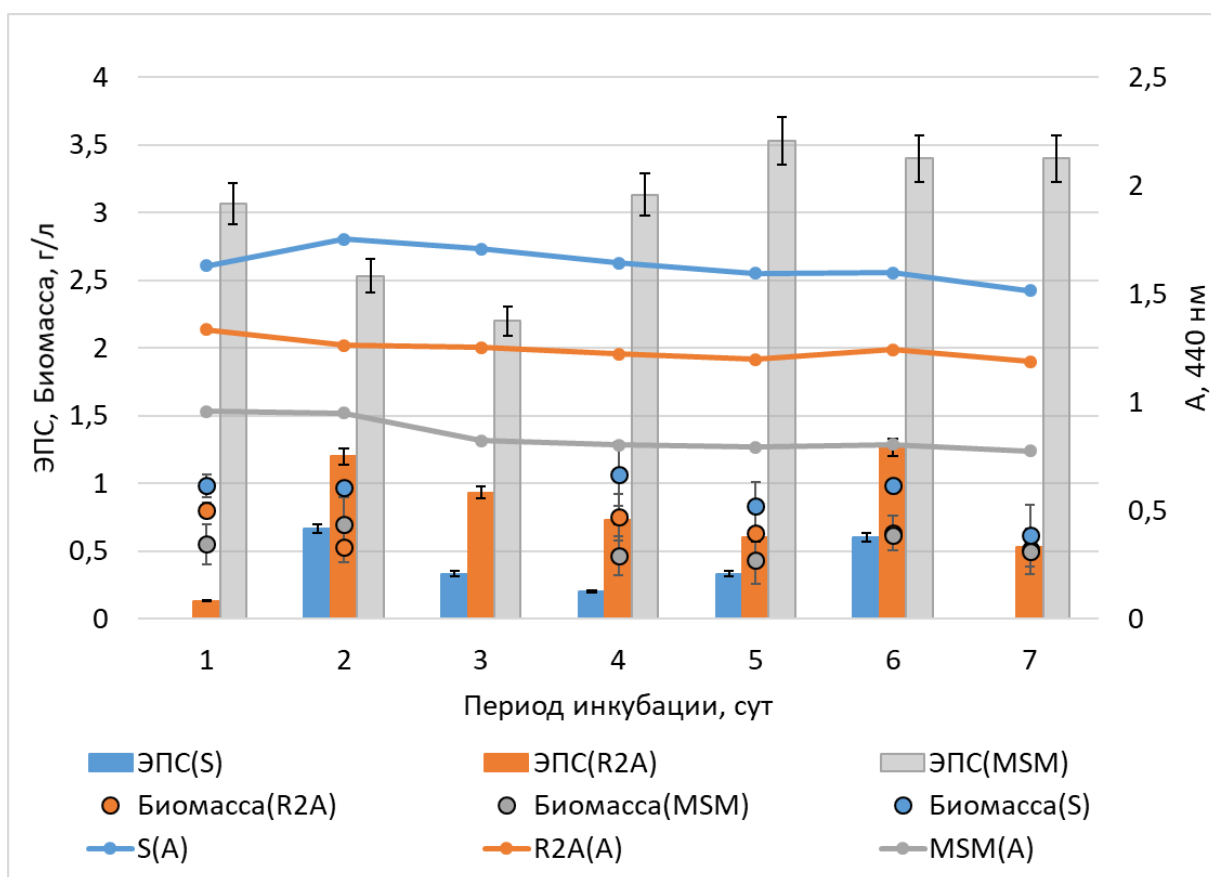


Рисунок 1 – Продукция ЭПС и биомассы, а также рост *E. meliloti* P221 на средах R2A, S, MSM

В результате эксперимента, целью которого была оценка влияния фенантрена на продукцию ЭПС штаммом *E. meliloti* P221, было показано стимулирующее влияние фенантрена на продукцию ЭПС (рисунок 2). При увеличении концентрации фенантрена происходило уменьшение значений оптической плотности, что говорит о его токсическом действии, приводящем к подавлению роста микроорганизмов. Тем не менее, рост бактериальной культуры не был угнетен полностью. Это объясняется тем, что исследуемый штамм был описан как деструктор ПАУ. Присутствие в среде фенантрена обуславливало включение защитных механизмов, в результате которых наблюдалась стимуляция продукции ЭПС.

В результате эксперимента, целью которого было определение продукции ЭПС при культивировании в присутствии тяжелых металлов не

было выявлено существенного различия в продукции ЭПС в используемых концентрациях катионов тяжелых металлов (0,01-0,1 ммоль/л) (рисунок 3). Это можно объяснить тем, что в данном диапазоне выбранных концентраций солей кадмия и цинка не происходит включение защитных механизмов в виде увеличения продукции ЭПС, что связано с меньшим токсическим действием металлов на микроорганизмы. Незначительная стимуляция продукции ЭПС наблюдалась при концентрации 0,1 ммоль/л Zn^{2+} и Cd^{2+} . Это может свидетельствовать о том, что защитные механизмы бактерий индуцируются с определенного значения концентрации токсиканта.

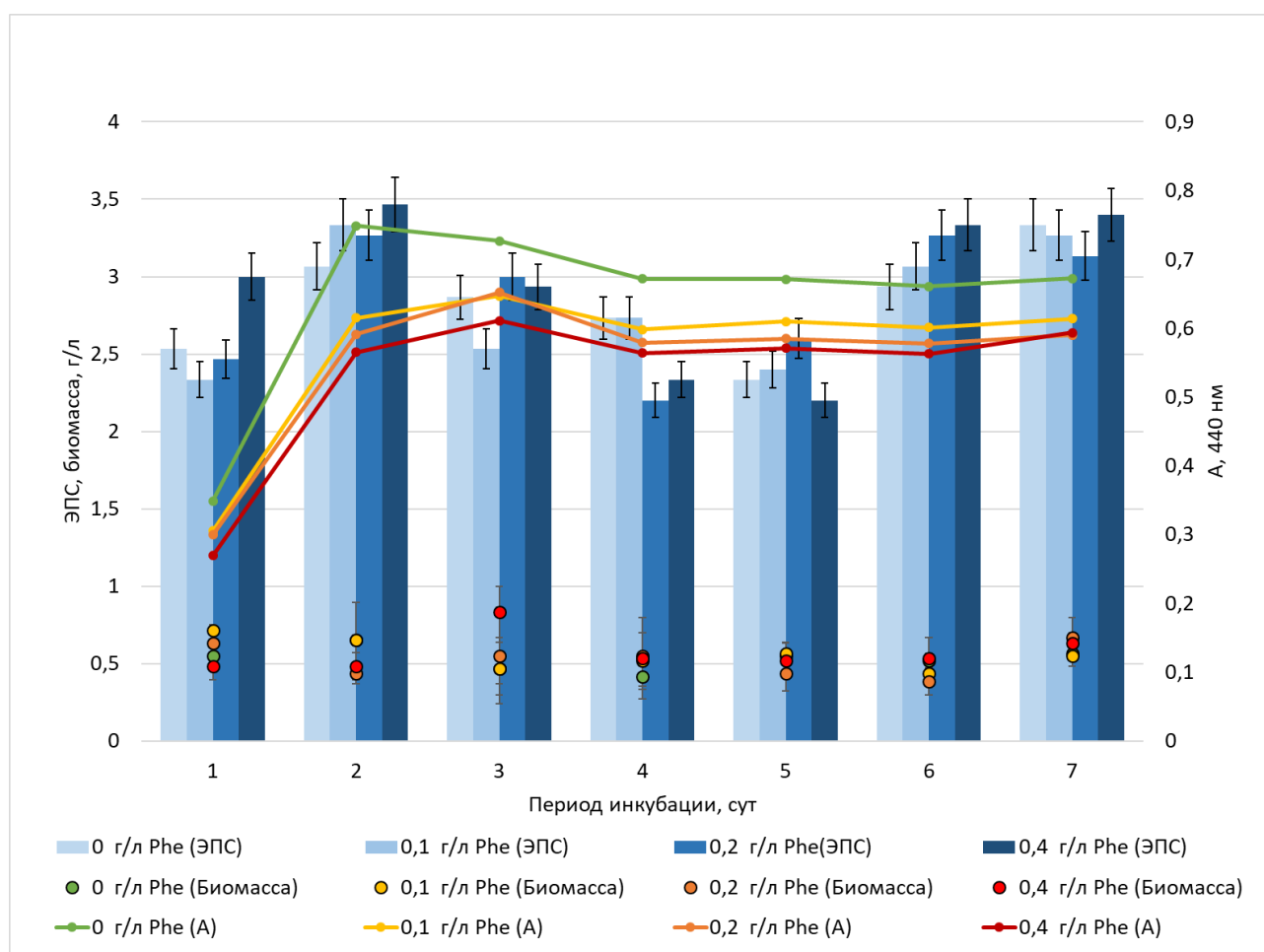


Рисунок 2 – Рост, продукция биомассы и ЭПС *E. meliloti* P221 в присутствии различных концентраций фенантрена

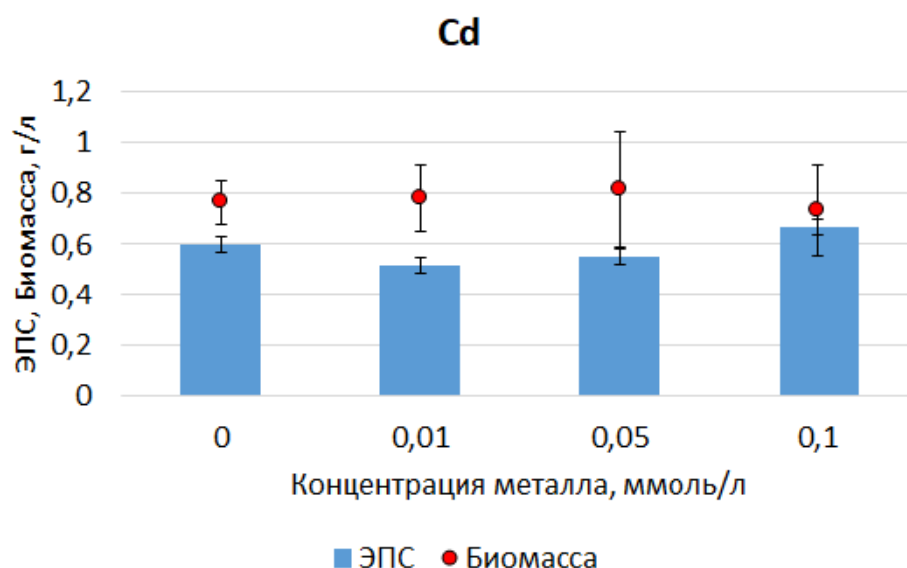
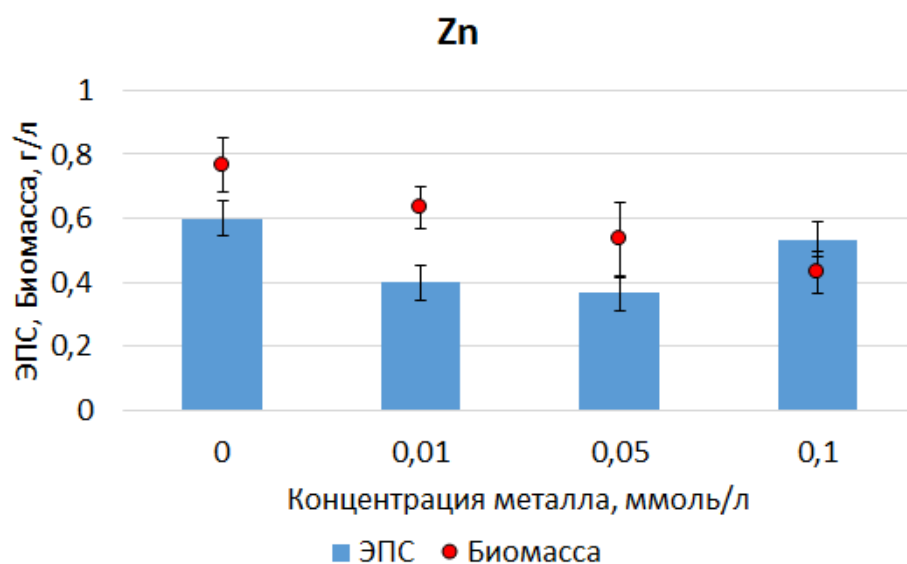


Рисунок 3 – Продукция ЭПС и биомассы в присутствии различных концентраций металлов для штамма *E. meliloti* P221

При оценке комплексного воздействия фенантрена и тяжелых металлов было выявлено их стимулирующее влияние на продукцию ЭПС штаммом *E. meliloti* P221, что может быть обусловлено включением защитных механизмов (рисунок 4).

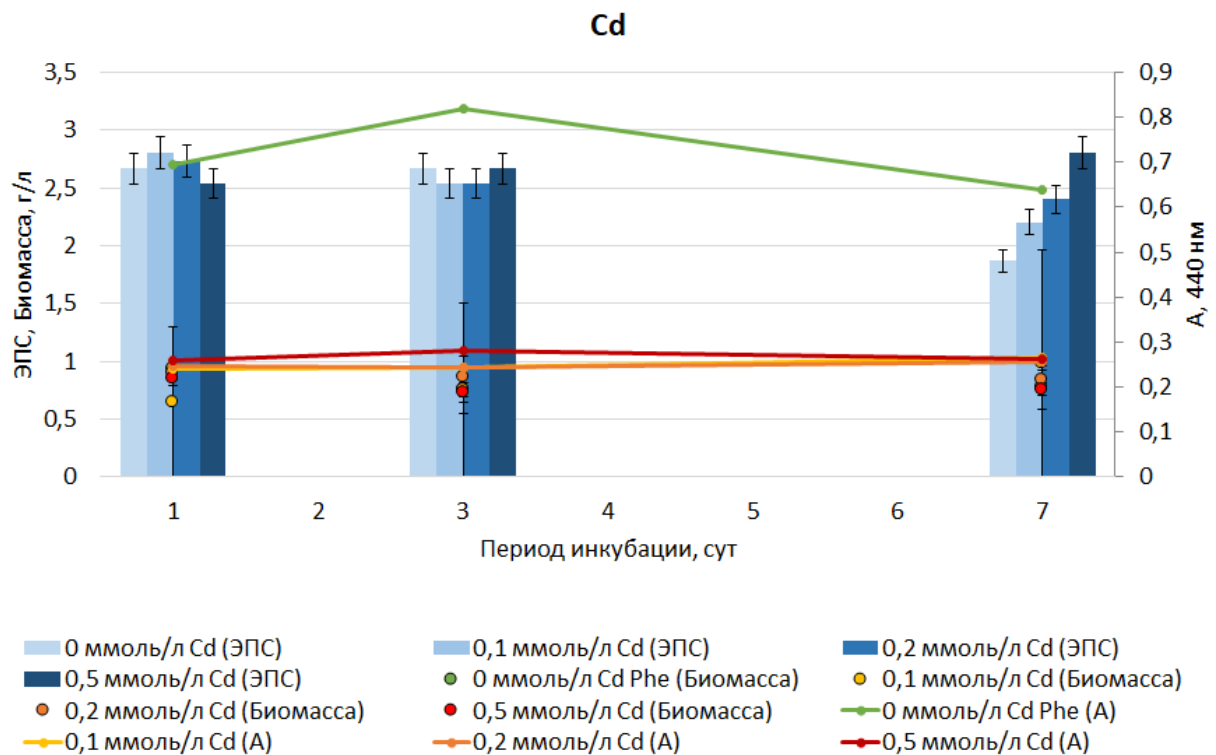
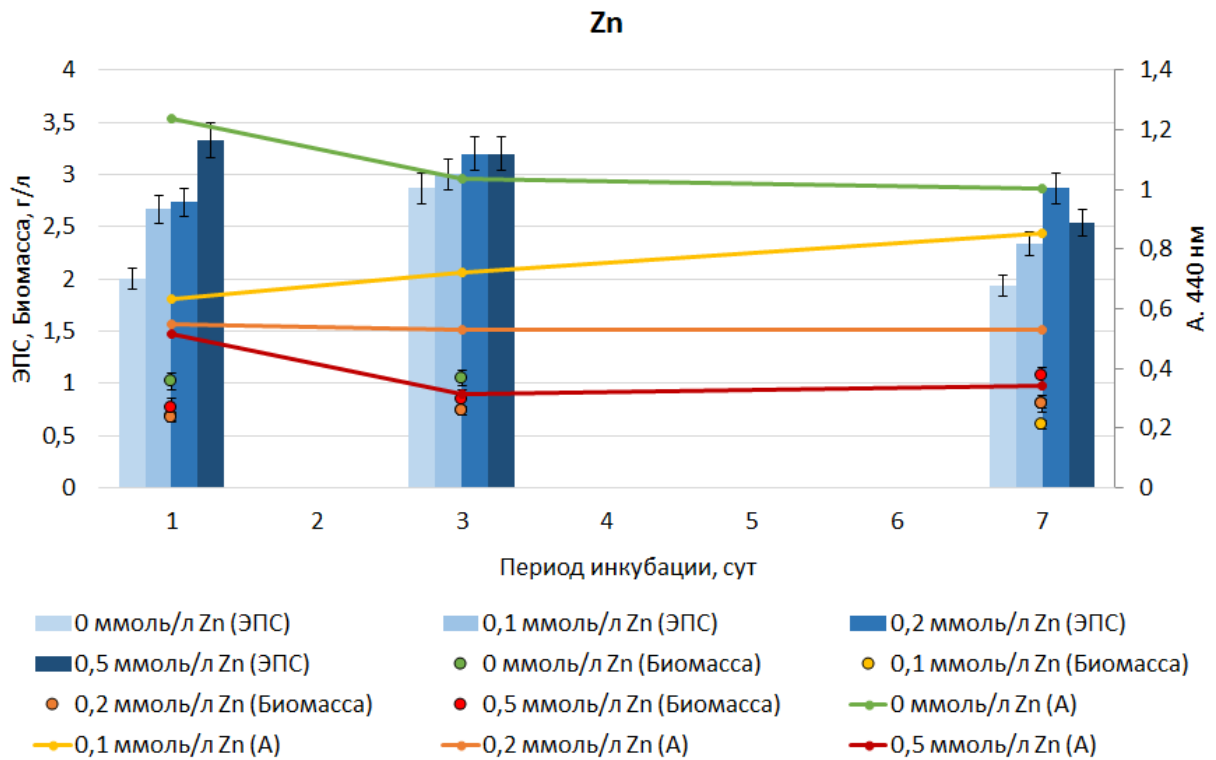


Рисунок 4 – Продукция ЭПС и биомассы, а также рост микроорганизмов в присутствии фенантрена и различных концентраций Zn и Cd для штамма *E. meliloti* P221

В соответствии с кривой роста, происходило возрастание биотоксичности металлов с увеличением их концентрации. Среди протестированных металлов наибольшим подавляющим действием характеризовался кадмий, вызывая заметную задержку роста уже при концентрации 0,1 ммоль/л. При этом в присутствии металлов наблюдалась стимуляция продукции ЭПС, что также может быть объяснено включением защитных механизмов.

Следует отметить, что для *E. meliloti* P221 в присутствии различных концентраций катионов металлов была отмечена тенденция снижения деградации фенантрена при возрастании концентрации металлов, что связано с токсическим действием металлов на ферменты, участвующие в деградации ПАУ. Однако исследуемый штамм не проявлял полную потерю способности к биодegradации фенантрена в используемом диапазоне концентраций катионов цинка и кадмия от 0,1 до 0,5 ммоль/л (рисунок 5).

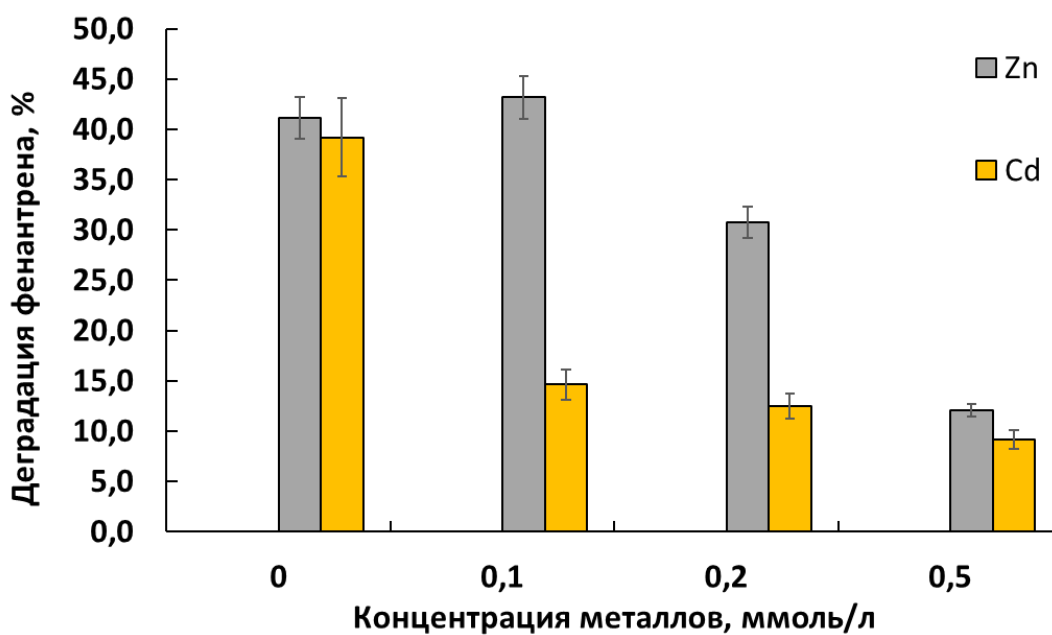


Рисунок 5 – Деградация фенантрена (0,2 г/л) штаммом *E. meliloti* P221 в минеральной среде в присутствии катионов цинка и кадмия

Анализ биомассы бактерий и ЭПС *E. meliloti* P221 после культивирования в присутствии 0, 1 ммоль/л солей кадмия и цинка продемонстрировал различия

в накоплении катионов тяжелых металлов. Из представленных на рисунке 6 данных следует, что биомасса бактерий сорбировала катионы тяжелых металлов в намного меньшем количестве, чем ЭПС. Это может быть объяснено тем, что из двух механизмов устойчивости к металлам, механизм внеклеточного барьера был эффективнее механизма, обеспечивающего поступление металла внутрь клетки для его дальнейшей детоксикации или эффлюкса.

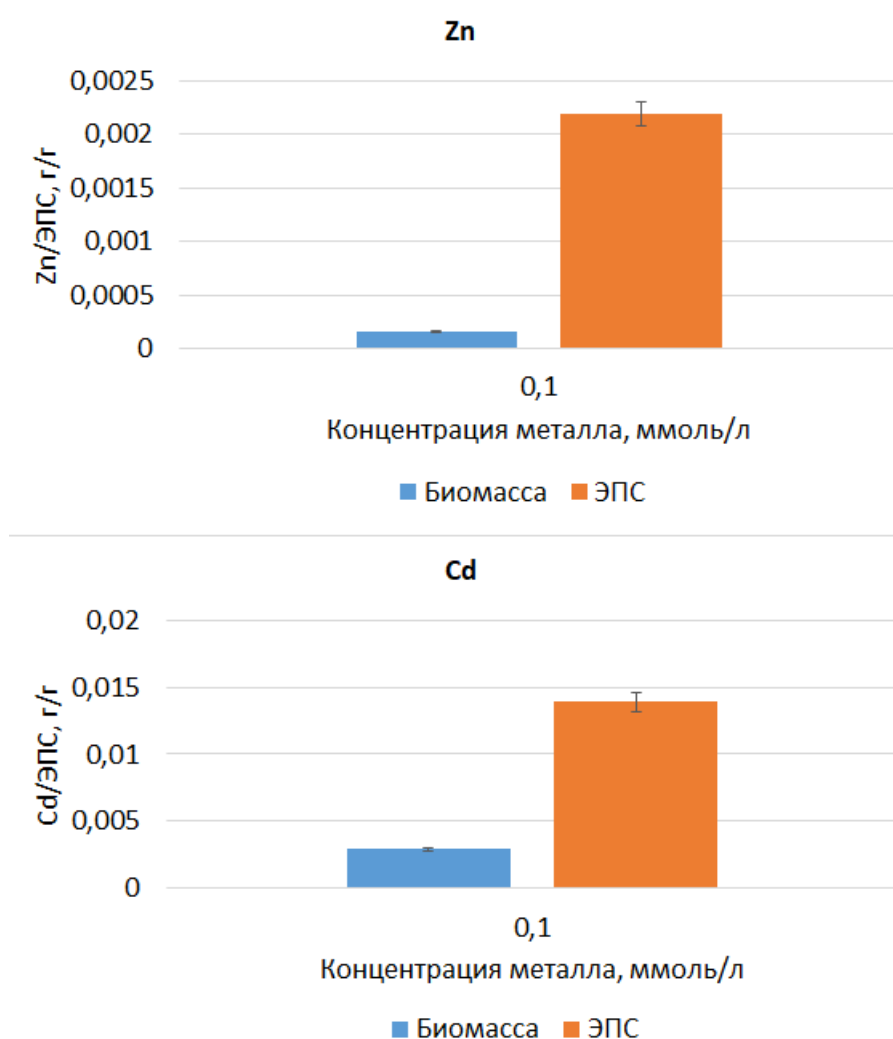


Рисунок 6 – Содержание цинка и кадмия во фракциях ЭПС и биомассы штамма *Ensifer meliloti* P221, определенное методом атомно-адсорбционной спектроскопии

Заключение. В ходе исследования устойчивости *E. meliloti* P221 и продукции ЭПС в присутствии цинка, кадмия и фенантрена были выполнены следующие задачи:

1. Оптимальной для продукции ЭПС штаммом *E. meliloti* P221 являлась минеральная среда MSM.
2. Отмечена тенденция увеличения продукции ЭПС при культивировании штамма *E. meliloti* P221 в присутствии катионов кадмия и цинка, фенантрена и при комплексном загрязнении.
3. Показана способность *E. meliloti* P221 к биодegradации фенантрена при росте в присутствии катионов кадмия и цинка.
4. Выявленное связывание тяжелых металлов ЭПС *E. meliloti* P221 является одним из механизмов устойчивости исследуемого штамма.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что штамм *E. meliloti* P221 является бифункциональным, что выражается в его способности к деградации ПАУ в присутствии тяжелых металлов. В связи с этим он может быть использован в качестве эффективной стратегии биоремедиации почв, загрязненных тяжелыми металлами и углеводородами.

