

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

Кафедра биохимии и биофизики

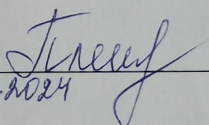
**ОСОБЕННОСТИ ДЕСТРУКТИВНОЙ АКТИВНОСТИ РИЗОСФЕРЫ
MEDICAGO SATIVA L. ПРИ ЗАГРЯЗНЕНИИ ПОЛИЦИКЛИЧЕСКИМИ
АРОМАТИЧЕСКИМИ УГЛЕВОДОРОДАМИ**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

студента 2 курса 241 группы
направления 06.04.01 Биология
Биологического факультета
Кузянова Дмитрия Андреевича

Научный руководитель:

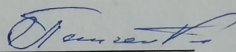
профессор кафедры биохимии
и биофизики, док. биол. наук


07.06.2024

Е.В. Плешакова

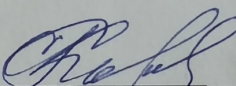
Научный консультант:

старший научный сотрудник
лаборатории экологической биотехнологии
ИБФРМ РАН, канд. биол. наук



Л.В. Панченко

Зав. кафедрой биохимии и биофизики,
профессор, док. биол. наук



С.А. Коннова

Саратов 2024

Введение. В настоящее время полициклические ароматические углеводороды (ПАУ) признаны приоритетными загрязнителями окружающей среды, возникающими как в результате естественных, так и антропогенных процессов. Их высокая токсичность и канцерогенность подчеркивают важность ремедиации загрязненных сред [1]. Ризоремедиация, инновационный метод восстановления загрязнённых почв, отличается универсальностью, неинвазивностью и устойчивостью, что делает его перспективным для экологического восстановления. Этот метод использует растения и связанные с ними ризосферные микроорганизмы для разложения загрязнителей. Растения через корневые экссудаты стимулируют каталитическую активность микроорганизмов. Метаболиты растений, такие как флавоноиды, действуют как сигнальные молекулы, поддерживая микробные сообщества в ризосфере, что усиливает деградацию и минерализацию органических токсикантов.

Эффективная биоремедиация требует понимания взаимодействий между растениями и микроорганизмами, а также анализа биохимических процессов, связанных с образованием растительных метаболитов и их влияния на деструкцию органических загрязнителей в почве [1, 2].

Цель настоящей работы заключалась в характеристике роли корневых экссудатов и ассоциированных с растениями микроорганизмов в процессе ризосферной деградации полициклического ароматического углеводорода — фенантрена. В связи с поставленной целью в настоящей работе решались следующие задачи:

1. Оценка влияния фенантрена и бактериализации штаммом *Ensifer meliloti* P221 на рост и развитие растений *Medicago sativa* L. в условиях вегетационного опыта;
2. Оценка влияния фенантрена и бактериализации штаммом *Ensifer meliloti* P221 на корневую экссудацию и выделение фенольных соединений в ризосфере *Medicago sativa* L.;
3. Определение ферментативной активности в тканях корней и корневых экссудатах люцерны и влияние на нее фенантрена и инокуляции

растений бактериальным штаммом *E. meliloti* P221;

4. Определение влияния компонентов корневых экссудатов на биodeградацию фенантрена ризосферным штаммом *Ensifer meliloti* P221;

5. Характеристика влияния бактериализации люцерны штаммом *Ensifer meliloti* P221 на ризосферную деградацию фенантрена.

В исследовании использовался штамм бактерий *Ensifer meliloti* P221, относящийся к семейству Rhizobiaceae. Он включен в коллекцию ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН под номером IBPPM 383 как симбиотический штамм, характерный для ризосферы *Medicago sativa* и деструктор фенантрена и флуорена [3].

В вегетационных опытах использовали люцерну посевную (*Medicago sativa* L.), типичного представителя семейства Бобовые (Fabaceae). Семена растения, произведенные компанией "Feldsaaten Freudenberger GmbH & Co KG" (Крефельд, Германия), соответствуют требованиям ГОСТ Р 52326-2005.

В данном исследовании фенантрен, являющийся побочным продуктом неполного сжигания топлива и древесины, рассматривается в качестве представителя ПАУ. Он присутствует в воздухе, воде и пищевых продуктах [1]. Также исследуются компоненты корневых экссудатов, такие как карбоновые кислоты (янтарная кислота) и флавоноиды (рутин, морин, кверцетин, нарингенин), которые были выбраны ввиду их широкого распространения в природе.

В экспериментах использовали семена *Medicago sativa* L., обработанные гипохлоритом натрия и проращённые на агаризованной среде ГРМ, которые засевали в колбы с кварцевым песком, увлажнённым средой Кнопа и обработанным фенантrenom до концентраций 0,2; 0,1 и 0,05 г/кг и инкубировали при 24-27°C и фотопериоде 16/8 часов в течение 14 суток. За два дня до завершения эксперимента ризосферный раствор высевали на среду ГРМ и инкубировали при 29°C в течение 5 суток для контроля стерильности. Растения извлекали, промывали и сушили. Надземные и подземные части разделяли, корни сканировали для оценки морфометрических показателей с

помощью программного обеспечения RhizoVision Explorer. Определяли сырую и сухую биомассу частей растений. В стерильные колбы добавляли дистиллированную воду, через сутки собирали и центрифугировали при 8000 об/мин в течение 10 минут. Супернатант использовали для анализа фенольных соединений, остаточного фенантрена и ферментативной активности.

Активность пероксидаз измеряли с использованием 50 мМ аскорбиновой кислоты, ABTS, o-DAZ, DAF и сирингальдазина в присутствии 10 мМ H_2O_2 при длинах волн 290, 460, 436, 600 и 525 нм соответственно. Буферы включали 0,05 М калий-фосфатный (pH 7,0), 0,05 М Na-K-фосфатный (pH 6,0) и 0,05 М натрий-тарtratный (pH 3,6). Активность оксидаз определяли с 50 мМ аскорбиновой кислоты и ABTS в 0,05 М калий-фосфатном (pH 7,0) и 0,05 М натрий-тарtratном буферах (pH 3,6) при длинах волн 290 и 436 нм соответственно. Удельную ферментативную активность выражали в Ед/мг белка.

Для анализа содержания белка и ферментативной активности в корнях *Medicago sativa* L., их гомогенизировали, ресуспендировали в 0,2 М Na-K-фосфатном буфере (pH 6,0) и центрифугировали при 10000 об/мин в течение 15 мин. Супернатант собирали, осадок ресуспендировали в буфере, повторно центрифугировали и объединяли супернатанты. Экстракты использовали для определения содержания белка и ферментативной активности.

Для количественного определения полифенольных соединений в корневых экссудатах использовали модифицированный метод Фолина-Чокальтеу с калибровкой по галловой кислоте. Абсорбцию измеряли фотометрически при 750 нм против дистиллированной воды. Остаточный фенантрен экстрагировали хлороформом. Полученные экстракты анализировали методом ВЭЖХ.

Культивирование микроорганизма проводилось в течение 14 суток на минеральной среде для ПАУ-деструкторов с янтарной кислотой (1,0 г/л) или без нее, с фенантrenom (0,2 г/л) и/или флавоноидами (морин, кверцетин, нарингенин, рутин) в концентрации 10 мкмоль/л. Рост штамма *E. meliloti* P221

оценивали по изменению оптической плотности культуральной жидкости при 440 нм. После центрифугирования определяли остаточное содержание фенантрена. Пробы с флавоноидами анализировали методом ВЭЖХ. Все данные подвергали статистической обработке.

Структура магистерской работы. Работа состоит из введения, основной части, заключения, выводов, списка использованных источников. Литературный обзор составлен на основе анализа 209 источников и включает в себя следующие вопросы: общие сведения о ПАУ, их влиянии на растительные и микробные организмы, а также о механизмах их нейтрализации и процессах ко-метаболизма ПАУ в присутствии корневых экссудатов растений, в частности фенольной природы. Магистерская работа написана грамотно, содержит обстоятельный обзор литературы и включает 114 страниц машинописного текста. Работа хорошо иллюстрирована, содержит 14 рисунков и 6 таблиц, что необходимо для наглядного представления полученных данных.

Научная новизна. Получены оригинальные данные о влиянии фенантрена и микроорганизма-деструктора углеводов на рост и развитие растения *Medicago sativa* L., а также на ферментативную активность его корневой системы в зависимости от характера поллютантного загрязнения. Впервые выявлено влияние фенантрена на содержание фенольных соединений в корневых экссудатах люцерны и на интенсивность корневой экссудации. Установлено, что корневые экссудаты люцерны поддерживают популяцию штамма *Ensifer meliloti* P221, что указывает на возможность сопряженного растительно-микробного метаболизма загрязнителей в ризосфере.

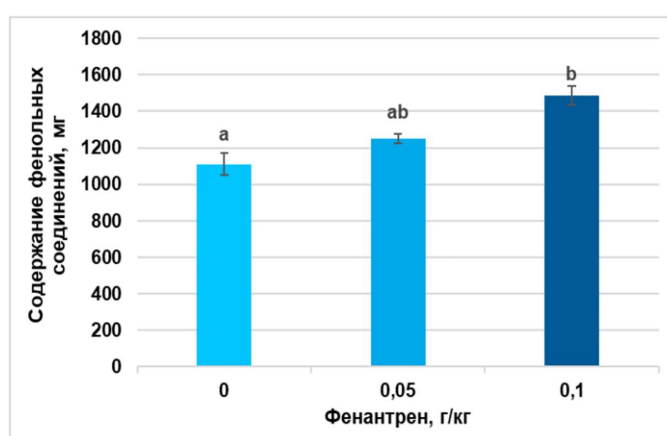
Практическая значимость. Обосновано применение растительно-микробных ассоциаций на основе *Medicago sativa* L. и ризосферного симбиотического штамма *Ensifer meliloti* P221 для очистки почв, загрязненных углеводородами.

Основное содержание работы. В ходе проведенной оценки параметров роста и развития растительного организма при его стерильном выращивании в песчаном грунте была отмечена значительная вариативность в динамике

морфометрических характеристик в зависимости от степени поллютантного загрязнения. Предполагается, что низкие концентрации токсичных веществ в грунте не стимулируют активацию защитных механизмов, а, наоборот, подавляют ростовую активность растения при первых признаках нарушения. В рамках нашего исследования было установлено, что низкие концентрации фенантрена (0,05 г/кг) приводят к снижению биомассы растений, а также угнетению длины, объема и площади корневой системы. Однако при высоких концентрациях фенантрена (0,1 и 0,2 г/кг) наблюдаемые показатели становятся ближе к контрольным значениям по сравнению с низкими концентрациями данного токсиканта, что, вероятно, обусловлено интенсификацией процессов формирования мелких разветвленных корневых волосков, способствующих максимальному использованию доступных ресурсов и компенсации негативного воздействия токсичного вещества. Также в процессе исследования было замечено, что высокие дозы фенантрена приводят к образованию плотной защитной оболочки вокруг основного корня растения, что также указывает на индукцию активных защитных механизмов растения в ответ на присутствие загрязняющего вещества.

Бактеризация незагрязненного токсикантом субстрата приводила к снижению морфометрических параметров растения, в то время как его биомасса сохранялась и даже несколько увеличивалась, что может быть связано с начальными стадиями клеточной дифференциации, возникающими в процессе образования клубеньков в результате симбиотического взаимодействия между растением и азотфиксирующими бактериями. Однако продолжительность эксперимента не позволила подтвердить это предположение. В то же время одновременное присутствие микроорганизма и загрязнителя в ростовом субстрате приводило к максимальному подавлению рассматриваемых в данном исследовании морфометрических параметров роста и развития растений, что, вероятно, связано с тем, что продукты микробной трансформации/деградации ПАУ обладают более выраженной фитотоксичностью по сравнению с исходным загрязнителем.

Корреляционный анализ выявил прямую положительную связь между концентрацией фенантрена в среде и содержанием фенольных соединений в корневых экссудатах ($r=0,99$, $A=1,7\%$). Присутствие фенантрена в концентрации 0,05 г/кг увеличивало содержание фенольных соединений на 13 %, а при 0,1 г/кг – на 34 % (рисунок 1). Несмотря на линейную зависимость, статистически значимым было только воздействие фенантрена в концентрации 0,1 г/кг ($p < 0,05$). Достоверных различий между концентрациями 0,05 и 0,1 г/кг не обнаружено ($p = 0,062874$).



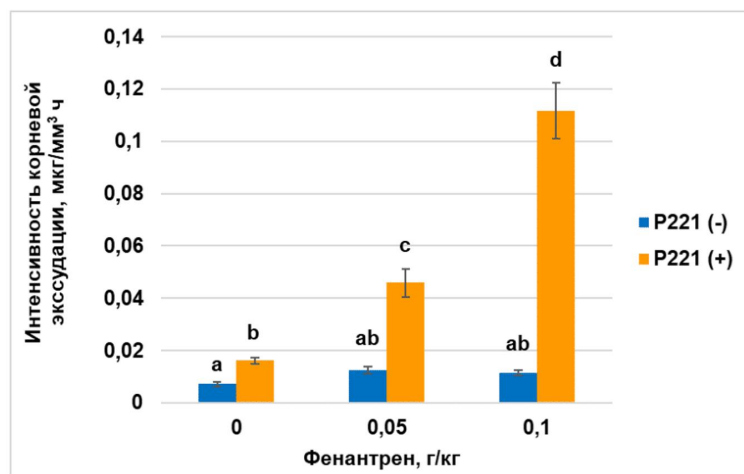
Средние значения, помеченные одинаковыми буквами, достоверно не отличаются друг от друга ($P= 0,05$)

Рисунок 1 – Влияние фенантрена на содержание фенольных соединений в корневых экссудатах растения *Medicago sativa* L.

Полученные данные соотносятся с результатами хроматографического анализа компонентов корневых экссудатов и морфометрическими характеристиками, указывая на вероятность того, что наблюдаемое явление, скорее всего, обусловлено изменениями морфологии корневой системы, в частности, формированием более разветвленной корневой системы в условиях поллютантного загрязнения. Это, вероятно, приводит к повышению эффективности экспрессии метаболитов корнями растения. Данный аспект, касающийся растения *Medicago sativa* L., впервые отмечен нами в настоящем исследовании.

В то же время, не удалось обнаружить прямой связи между значительным

ростом количественного содержания фенольных соединений в присутствии только штамма *E. meliloti* P221 или в сочетании с токсикантом и интенсивностью корневой экссудации растения (рисунок 2).



Средние значения, помеченные одинаковыми буквами, достоверно не отличаются друг от друга ($P = 0,05$)

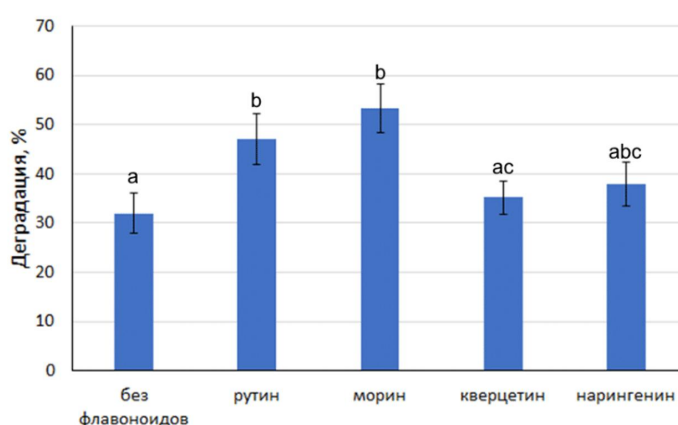
Рисунок 2 – Влияние фенантрена и штамма *Ensifer meliloti* P221 на интенсивность корневой экссудации растения *Medicago sativa* L. на единицу объема, мм³

Результаты хроматографического анализа позволяют объяснить наблюдаемый эффект наличием в субстрате продуктов деструкции/трансформации фенантрена и микробных метаболитов фенольной природы.

Исследование ферментативной активности корневой системы растений позволило охарактеризовать ее реакцию на такие факторы, как присутствие фенантрена и инокуляция бактериальным штаммом *E. meliloti* P221, посредством изменения активности ферментов пероксидазы и оксидазы. Было установлено, что загрязнение среды фенантrenom вызывает снижение ферментативной активности, при этом наиболее выраженное влияние наблюдалось в присутствии двух субстратов – ABTS и аскорбиновой кислоты. Инокуляция бактериальным штаммом также приводила к угнетению ферментативной активности, как в корнях растений, так и в корневых

экссудатах. Совместное воздействие фенантрена и бактериального штамма *E. meliloti* P221 вызывало наиболее выраженное увеличение активности оксидаз и пероксидаз, что, вероятно, связано как с ферментативным вкладом самих микроорганизмов, так и с образованием необходимых ферментативных субстратов в ризосфере под их влиянием. При этом доминирующей была пероксидазная активность, с преобладанием активности аскорбатпероксидазы. Среди оксидаз наибольшую ферментативную активность продемонстрировала оксидаза, катализирующая окисление аскорбиновой кислоты.

Проведенное исследование продемонстрировало стимулирующее действие основных компонентов корневых экссудатов, а именно карбоновых кислот (на примере янтарной кислоты) и флавоноидов (на примере флавонона нарингенина и флавонолов рутина, морина и кверцетина), на микробную деградацию фенантрена ризобактерией *Ensifer meliloti* (рисунок 3).

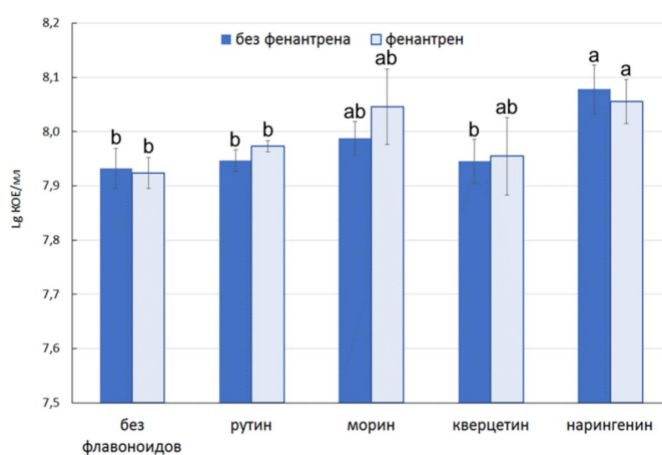


Средние значения, помеченные одинаковыми буквами, достоверно не отличаются друг от друга ($P = 0,05$)

Рисунок 3 – Деградация фенантрена культурой *Ensifer meliloti* P221 на среде с фенантrenom, флавоноидами и янтарной кислотой

Из четырех исследованных флавоноидов только рутин, морин и нарингенин в концентрации 10 мкмоль/л стимулировали деградацию фенантрена ризобактерией. Расчет эффективности деградации фенантрена единицей биомассы штамма *E. meliloti* P221 показал, что стимуляция деградации ПАУ флавоноидами не связана исключительно с увеличением микробной биомассы и является наибольшей в присутствии морина и рутина.

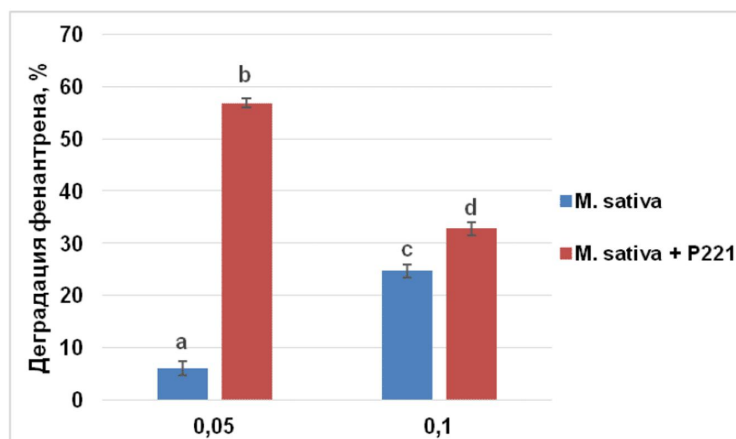
Установлено, что карбоновая кислота служит основным ростовым субстратом для микроорганизма, в то время как флавоноиды и ПАУ, концентрации которых существенно ниже, как в культуральной среде, так и в реальных условиях, оказывают незначительное влияние на рост бактерий. Однако добавление к янтарной кислоте фенантрена или флавоноидов, и особенно их совместное применение, увеличивало прирост биомассы (рисунок 4).



Средние значения, помеченные одинаковыми буквами, достоверно не отличаются друг от друга ($P = 0,05$)

Рисунок 4 –Рост *Ensifer meliloti* P221 на среде с фенантреном, флавоноидами и янтарной кислотой

Дополнительно результаты исследования деградационного потенциала комплекса "растение-микроорганизм" показали, что фенантрен подвергается процессу элиминации из ростового субстрата также и в присутствии растения. Наибольшая эффективность деструкции отмечена в присутствии микроорганизма, что обусловлено высокой активностью его ферментативной системы. Наблюдаемое усиление деструктивного потенциала в ризосфере люцерны при инокуляции штаммом *E. meliloti* P221 свидетельствует о значимости использования симбиотического комплекса "растение-микроорганизм" для фиторемедиации загрязненных почв по сравнению с применением только растительных агентов (рисунок 5).



Средние значения, помеченные одинаковыми буквами, достоверно не отличаются друг от друга ($P = 0,05$)

Рисунок 5 – Влияние растения *M. sativa* L. и штамма *E. meliloti* P221 на деградацию фенантрена

Таким образом, результаты проведенного исследования в области технологии биоремедиации выявляют сложные механизмы реакции растений на различные факторы окружающей среды, включая загрязнение ПАУ и их взаимодействие с ассоциированными микроорганизмами. Кроме того, установлено, что эффективность микробной деградации ПАУ зависит от наличия и состава компонентов корневых экссудатов растений. Данный аспект имеет ключевое значение для разработки эффективных стратегий биоремедиации почв, загрязненных ПАУ.

Заключение: ПАУ признаны приоритетными загрязнителями окружающей среды из-за их высокой токсичности и канцерогенности. В связи с этим возникает необходимость разработки методов ремедиации загрязненных ПАУ сред. Наше исследование показало, что фенантрен оказывает значительное влияние на рост и развитие люцерны, угнетая её при низких концентрациях и активируя защитные механизмы растения при высоких. Бактеризация ризосферы увеличивала биомассу растения, но в совокупности с токсикантом подавляла рост растения из-за фитотоксичности продуктов микробной трансформации фенантрена.

Установлено, что фенантрен влияет на содержание фенольных соединений, изменяя морфологию корней и стимулируя экссудацию вторичных метаболитов. Исследование ферментативной активности корневой системы показало, что бактериализация загрязненного субстрата увеличивает активность пероксидаз и оксидаз, особенно аскорбатпероксидазы.

Карбоновые кислоты и флавоноиды стимулируют микробную деградацию фенантрена ризобактерией *Ensifer meliloti* и поддерживают её популяцию. Среди флавоноидов рутин, морин и нарингенин наиболее эффективно стимулируют деградацию фенантрена.

Комплекс "растение-микроорганизм" продемонстрировал наибольшую эффективность в разложении фенантрена, что подчёркивает значимость использования симбиотических взаимосвязей для фиторемедиации загрязненных почв. Таким образом, результаты исследования раскрывают сложные механизмы реакции растений на загрязнение ПАУ и их взаимодействие с микроорганизмами, что необходимо учитывать при разработке методов биоремедиации.

Выводы: 1. При выращивании *Medicago sativa* L. на песчаной культуре с фенантrenom выявлена зависимость морфометрических показателей от концентрации загрязнителя. Фенантрен в концентрации 0,05 г/кг подавлял рост люцерны, снижая длину, объем и площадь корней, а также биомассу растений. В концентрациях 0,1 и 0,2 г/кг фенантрен, напротив, увеличивал объем и площадь корней, а также биомассу. Бактериализация *E. meliloti* P221 снижала все морфометрические показатели растений, но способствовала увеличению биомассы. Совместное присутствие *E. meliloti* P221 и фенантрена приводило к максимальному снижению всех морфометрических параметров.

2. Впервые установлено, что фенантрен стимулирует корневую экссудацию и выделение фенольных соединений в ризосфере *Medicago sativa* L. Показано, что увеличение содержания фенольных соединений связано как с продуктами деструкции фенантрена, так и с метаболитами *E. meliloti* P221 при бактериализации растений отдельно и в сочетании с фенантrenom.

3. Выявлено снижение активности оксидаз и пероксидаз в тканях корней и корневых экссудатах люцерны под воздействием фенантрена и при бактеризации *E. meliloti* P221, максимально выраженное при использовании аскорбиновой кислоты и ABTS в качестве субстратов. Совместное воздействие фенантрена и *E. meliloti* P221 усиливало активность пероксидаз и оксидаз, особенно аскорбатпероксидазы.

4. Янтарная кислота и флавоноиды (рутин, морин и нарингенин), как основные компоненты корневых экссудатов, стимулировали деградацию фенантрена ризобактерией *E. meliloti* P221, морин и рутин – наиболее эффективно. Янтарная кислота являлась основным ростовым субстратом *E. meliloti* P221, флавоноиды и фенантрен не влияли на рост. Добавление фенантрена и/или флавоноидов к янтарной кислоте способствовало увеличению биомассы ризобактерии.

5. Установлено, что растение способствует удалению фенантрена из субстрата, однако наибольшая эффективность достигается при добавлении микроорганизма. Инокуляция *E. meliloti* усиливает деструктивный потенциал в ризосфере люцерны, что подтверждает важность симбиоза для фиторемедиации.

Список использованных источников:

1. Abdel-Shafy, H. I. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: source, environmental impact, effect on human health and remediation / H. I. Abdel-Shafy, M. S. M. Mansour // Egyptian Journal of Petroleum. – 2016. – Vol. 25, N 1. – P. 107-123.
2. Maliszewska-Kordybach, B. Ecotoxicological activity of soils polluted with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-effect on plants / B. Maliszewska-Kordybach, B. Smreczak // Environmental Technology. – 2000. – Vol. 21, N 10. – P. 1099-1110.
3. Plant-rhizosphere-microflora association during phytoremediation of PAH-contaminated soil / A. Muratova [et al.] // International Journal of Phytoremediation. – 2003. – Vol. 5, N 2. – P. 137-151.

