

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

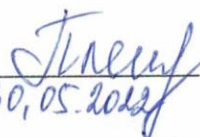
Кафедра биохимии и биофизики

ВЛИЯНИЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ ФЛАВОНОИДОВ НА ДЕГРАДАЦИЮ
ПОЛИЦИКЛИЧЕСКОГО АРОМАТИЧЕСКОГО УГЛЕВОДОРОДА
ФЕНАНТРЕНА РИЗОСФЕРНЫМ ШТАММОМ *MICOLICIBACTERIUM*
GILVUM PAM1

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

студента 4 курса 421 группы
направления 06.03.01 Биология
Биологического факультета
Кузянова Дмитрия Андреевича

Научный руководитель:
профессор кафедры биохимии
и биофизики, док. биол. наук


30.05.2022


Е.В. Плешакова

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


30.05.2022

Л.В. Панченко

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


30.05.2022

С.А. Коннова

Саратов 2022

Введение. На сегодняшний день полициклические ароматические углеводороды (ПАУ) признаны приоритетными загрязняющими веществами окружающей среды. Эти загрязнители попадают в окружающую среду в результате естественных процессов (например, лесные пожары или извержения вулканов), либо антропогенной деятельности (промышленное производство, разлив нефти, сжигание отходов). Вредные свойства ПАУ, такие как высокая токсичность и канцерогенность, сделали ремедиацию загрязненных ими сред крайне важной задачей.

Одним из основных инновационных способов восстановления загрязненных почв является ризоремедиация [1, 2]. Ризоремедиация обладает потенциальной универсальностью (в обработке широкого спектра опасных загрязняющих веществ), а также неинвазивностью и устойчивостью, что делает ее привлекательной технологией для экологического восстановления загрязненных участков [2].

Ризоремедиация включает использование определенных растений и связанных с ними ризосферных микроорганизмов для разложения целевых загрязнителей. Растения косвенно действуют в том процессе, стимулируя каталитическую активность микроорганизмов через корневые экссудаты [3]. Так, выделяемые растениями метаболиты (например, флавоноиды) выступая в качестве сигнальных молекул, способствуют поддержанию популяционной структуры ассоциированных микробных сообществ в ризосфере, что, в свою очередь, приводит к усилению деградации, минерализации и/или полимеризации органических токсикантов [4, 5].

Предполагается, что сходство в химической структуре между представителями веществ фенольного ряда (флавоноидов) и ПАУ/полихлорированными бифенилами (ПХБ) может способствовать увеличению интенсивности деструкции поллютантов почвенной микрофлорой [6, 7].

Объект исследования – ризосферный штамм *Mycolicibacterium gilvum* РАМ 1, относится к семейству *Mycobacteriaceae*. Штамм *M. gilvum* РАМ 1 выделен сотрудниками лаборатории экологической биотехнологии ИБФРМ

РАН как деструктор фенантрена (а также пирена, антрацена, флуорена, флуорантена) из ризосферы люцерны (*Medicago sativa* L.) [8].

Исследованный в нашей работе представитель ПАУ – фенантрен, является побочным продуктом неполного сжигания ископаемого топлива и древесины и присутствует в окружающем воздухе, поверхностной и питьевой воде, а также пищевых продуктах [1, 2].

В настоящей работе исследуются компоненты корневых экссудатов: карбоновые кислоты (на примере янтарной кислоты) и флавоноиды (на примере рутина и морины). Выбор веществ в качестве объектов исследования обусловлен их распространенностью в природе.

Цель настоящей работы – изучение влияния растительных флавоноидов на ростовую активность и деструкционную способность ризосферного штамма *Mycolicibacterium gilvum* РАМ 1 по отношению к полициклическому ароматическому углеводороду фенантрону.

В связи с поставленной целью в настоящей работе решаются следующие задачи:

1. Оценка влияния флавоноида рутина на ростовую активность и деструктивную способность штамма *M. gilvum* РАМ 1.
2. Оценка влияния флавоноида морины на ростовую активность и деструктивную способность штамма *M. gilvum* РАМ 1.
3. Оценка влияния янтарной кислоты на ростовую активность и деструктивную способность штамма *M. gilvum* РАМ 1.

Исследование проводилось с использованием методов, адекватных поставленным задачам.

Культивирование микроорганизма осуществлялось в течение 14 суток на минеральной среде для ПАУ-деструкторов следующего состава (г/л): $K_2PO_4 \times 3H_2O$ – 0,7; NH_4Cl – 1,0; Na_2SO_4 – 2,0; KNO_3 – 2,0; $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0,2; KOH – 5,0; янтарная кислота – 1,0 или 5,0 [8]; раствор микроэлементов (г/л): H_3BO_3 – 0,5; $CuSO_4 \times 5H_2O$ – 0,04; KI – 0,1; $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \times 4H_2O$ – 0,2; $MnSO_4 \times H_2O$ – 0,4; $ZnSO_4 \times 7H_2O$ – 0,4. Раствор микроэлементов – 1 мл;

агаризованная среда МПА. В качестве источника углерода в среду добавлялся фенантрен в концентрации 200 мг/л.

В соответствии с вариантами экспериментов культивирование осуществлялось в присутствии янтарной кислоты (1,0 и 5,0 г/л) или без нее, с добавлением фенантрена в концентрации 0,2 г/л и/или с добавлением рутина и морины. Влияние флавоноидов на рост культуры оценивали, внося в среду рутин в концентрациях 0,005, 0,01, 0,05, 0,1 и 0,2 ммоль/л и морин в концентрации 0,01 ммоль/л в зависимости от задач эксперимента. Все эксперименты проводили в трех повторностях. Оценка роста культуры осуществлялась путем измерения оптической плотности культуральной жидкости.

Культуральную жидкость отделяли от бактериальных клеток центрифугированием и определяли остаточное содержание фенантрена и флавоноидов. Экстракцию фенантрена проводили хлороформом в течение 10 минут на орбитальном шейкере. Процедура экстракции проводилась трижды для каждой из колб. Весь экстрагированный фенантрен анализировался методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Пробы в рутином и морином центрифугировали при 9000 об/мин в течение 10 минут. Определение рутина и морины проводили методом ВЭЖХ.

Все полученные экспериментальные данные подвергали статистической обработке.

Структура бакалаврской работы. Работа состоит из введения, основной части, заключения, выводов, списка использованных источников. Литературный обзор составлен на основе анализа 89 источников и включает в себя следующие вопросы: общие сведения о ПАУ и флавоноидах, пути деструкции ПАУ бактериями семейства *Mycobacteriaceae*, биологическая роль флавоноидов и их влияние на деградацию ПАУ микроорганизмами.

Основное содержание работы. Результатом исследования, проводившегося методами, описанными выше, стало установление зависимости между концентрацией корневых экссудатов в среде

культивирования и приростом биомассы штамма *M. gilvum* РАМ 1 в присутствии и отсутствии фенантрена в концентрации 0,2 г/л. Выявлено, что увеличение содержания в среде как флавоноидов (рутина и морина), так и янтарной кислоты способствует повышению ростовой активности исследуемой бактерии. Комплексное внесение веществ в среду значительно усиливает этот процесс. Необходимо также отметить, что рост штамма в присутствии фенантрена несколько снижался, что может быть связано с одновременным использованием в качестве ростового субстрата ПАУ и янтарной кислоты. При этом фенантрен поддерживал рост микроорганизма слабее, чем сукцинат.

Так, в вариантах среды, содержащих рутин в концентрации 0,05 ммоль/л в качестве единственного источника углерода и энергии, ростовая активность штамма *M. gilvum* РАМ 1 была наименьшей, и прирост биомассы превысил исходную посевную дозу лишь в 1,4 раза (рисунок 1Б) что, вероятно, связано с низким содержанием флавоноида в среде.

В вариантах среды с добавлением к рутину (0,05 ммоль/л) янтарной кислоты в концентрации 5,0 г/л, прирост микробной биомассы увеличился в 7,2 раз (рисунок 1А). Однако внесение янтарной кислоты в концентрации 1,0 г/л приводило к увеличению прироста биомассы всего в 1,4 раза, то есть увеличение биомассы было таким же, как в присутствии рутина при отсутствии сукцината (рисунок 1Г).

В вариантах среды с добавлением к рутину (0,005 ммоль/л) янтарной кислоты в концентрации 1,0 г/л прирост биомассы микроорганизма увеличивался в 3,4 раза относительно исходной посевной дозы (рисунок 1В). С увеличением концентрации флавоноида в среде культивирования (до 0,01 ммоль/л) наблюдалось возрастание ростовой активности штамма *M. gilvum* РАМ 1 в 5 (рисунок 1Г) и 7 раз (рисунок 1Б) для концентраций 0,01 и 0,05 ммоль/л соответственно. В концентрациях рутина 0,1 и 0,2 ммоль/л рост штамма возрастал в 6 раз относительно исходной посевной дозы (рисунок 1А). Предполагается, что флавоноид рутин в комплексе с сукцинатом,

выступая в роли витамина, оказывал стимулирующее влияние на метаболические процессы бактерии.

В вариантах среды с добавлением к янтарной кислоте (в концентрации 1,0 г/л) флавоноида морины в концентрации 0,01 ммоль/л, прирост микробной биомассы увеличился в 5 раз относительно исходной посевной дозы (рисунок 1Г).

В отсутствие флавоноидов (рутина и морины) сукцинат в концентрации 1,0 г/л увеличивал прирост биомассы приблизительно в 4 раза (рисунок 1).

Через 14 сут. эксперимента, проводившегося методами, описанными выше, внесённый в среду в качестве единственного источника углерода и энергии фенантрен увеличивал прирост микробной биомассы *M. gilvum* РАМ 1 в 2 раза относительно исходной посевной дозы (рисунок 1Б). Известно, что многие карбоновые кислоты (в том числе и сукцинат), часто встречаются в экссудатах корней растений и активно используются почвенными микроорганизмами в качестве ростового субстрата [9]. Так, добавление янтарной кислоты (концентрация 1,0 г/л) в качестве ко-субстрата обеспечивало прирост культуры микроорганизма в среднем в 4 раза относительно исходной посевной дозы (рисунок 1Б, В, Г). Внесение сукцината в концентрации 5,0 г/л в присутствии фенантрена увеличивало рост бактерии в 6,8 раз (рисунок 1А).

Ростовая активность штамма *M. gilvum* РАМ 1 на среде с фенантреном при добавлении флавоноида рутин в концентрации 0,05 ммоль/л увеличивалась в 2 раза относительно исходной посевной дозы.

Комплексное внесение флавоноидов (в концентрациях 0,005, 0,01 и 0,05 ммоль/л) и янтарной кислоты (в концентрации 1,0 г/л) в среду с фенантреном значительно стимулировало рост микробного штамма. Флавоноид рутин в комплексе с сукцинатом увеличивал прирост микроорганизма в 4,32, 5,1 и 4,94 раза относительно исходной посевной дозы (в концентрациях 0,005, 0,01 и 0,05 ммоль/л соответственно) (рисунок 10В, Г). В вариантах культивирования с флавоноидом рутином и янтарной

кислотой (5,0 г/л) наблюдался прирост биомассы микроорганизма в 6,52, 6,9 и 7,7 раз относительно исходной посевной дозы для концентраций 0,05, 0,1 и 0,2 ммоль/л соответственно (рисунок 10А). Внесение флавоноида морина в среду в концентрации 0,01 ммоль/л обеспечивало прирост в 5,6 раз (рисунок 10Г).

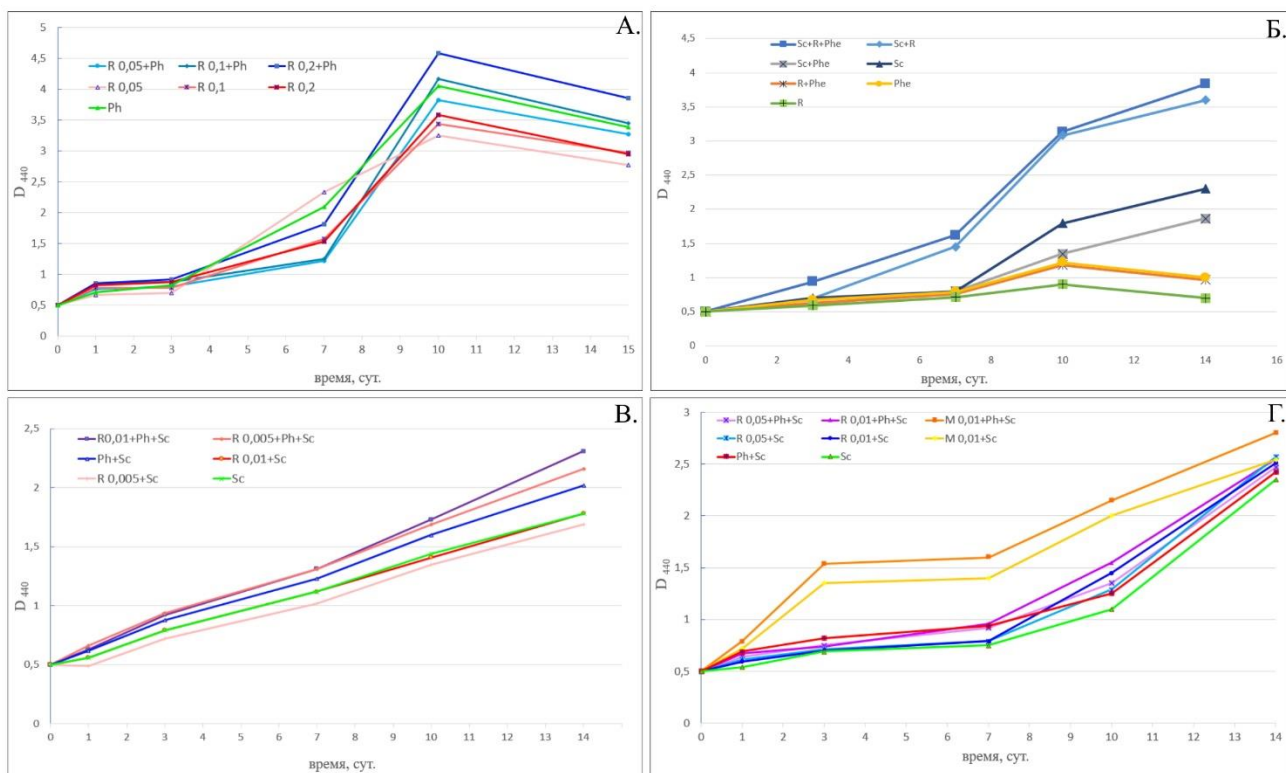


Рисунок 1 – Рост ризосферного штамма *M. gilvum* PAM 1 в модельных условиях:

А – Влияние концентрации рутина на рост штамма *M. gilvum* PAM 1 на среде с фенантреном и янтарной кислотой (5,0 г/л): R – рутин; Phe – фенантрен (0,2 г/л); Б - Влияние фенантрена, рутина и янтарной кислоты на рост *M. gilvum* PAM 1 в жидкой минеральной среде: R – рутин (0,05 ммоль/л); Sc – янтарная кислота (1,0 г/л); Phe – фенантрен (0,2 г/л); В - Влияние концентрации рутина на рост штамма *M. gilvum* PAM 1 на среде с фенантреном и янтарной кислотой (1,0 г/л): R – рутин; Phe – фенантрен (0,2 г/л); Г - Влияние концентраций рутина и морина на рост штамма *M. gilvum* PAM 1 на среде с фенантреном и янтарной кислотой (1,0 г/л): R – рутин; Phe – фенантрен (0,2 г/л)

Таким образом, полученные результаты демонстрируют стимулирующее влияние компонентов корневых экссудатов на ростовую активность ризосферного штамма *M. gilvum* РАМ 1 в среде, содержащей модельный токсикант фенантрен и без него.

Одной из задач настоящей работы являлось исследование влияния компонентов корневых экссудатов (флавоноидов и карбоновых кислот) на деградацию фенантрена штаммом *M. gilvum* РАМ 1.

Таблица 1 – Результаты экспериментов по оценке деструктивного влияния штамма *M. gilvum* РАМ 1 на фенантрен

№ п/п	Присутствие в среде:					Остаточное содержание фенантрена в среде (мг/мл)	Деградация фенантрена (%)
	Штамма <i>M.</i> <i>gilvum</i> РАМ 1	Фенантр ена (0,2 г/л)	Рутина (ммоль /л)	Морина (ммоль/ л)	Сукцинат (г/л)		
Эксперимент №1							
1	+	+	0,01	-	1,0	0,1132±0,0069	43,40±3,1
2	+	+	0,005	-	1,0	0,1310±0,0066	32,90±5,8
3	+	+	-	-	1,0	0,1435±0,0186	29,60±6,8
Эксперимент №2							
1	+	+	0,05	-	1,0	0,1214±0,0005	39,50±0,5
2	+	+	0,01	-	1,0	0,1077±0,0029	43,60±1,5
3	+	+	-	0,01	1,0	0,1223±0,0166	39,4±8,2
4	+	+	-	-	1,0	0,1488±0,0050	27,90±2,4
Эксперимент №3							
1	+	+	0,05	-	1,0	0,1126±0,0128	45,58±6,2
2	+	+	0,05	-	0	0,1233±0,0142	41,48±6,7
3	+	+	-	-	1,0	0,1372±0,0131	38,31±5,9
4	+	+	-	-	0	0,1050±0,0018	34,40±1,1
Эксперимент №4							
1	+	+	0,05	-	5,0	0,0636±0,0472	68,21±11,9
2	+	+	0,1	-	5,0	0,1034±0,0536	56,72±6,8
3	+	+	0,2	-	5,0	0,1470±0,0156	26,52±4,3
4	+	+	-	-	5,0	0,0854±0,0178	59,78±10,8

Результатом экспериментов, проводившихся методами, описанными выше, стало установление того, что:

- в отсутствие компонентов корневых экссудатов модельный токсикант фенантрен подвергался деструкции штаммом *M. gilvum* РАМ 1 в среднем на 30% (рисунок 2Б, В, Г, таблица 1);

- в вариантах среды, содержащих только флавоноид рутин (в концентрации 0,05 ммоль/л), деструкция фенантрена составляла 41,5% относительно исходной концентрации (рисунок 2Б, таблица 1);

- в вариантах среды, содержащих рутин (в концентрации 0,05 ммоль/л) и сукцинат (в концентрации 5,0 г/л), деструкция фенантрена микроорганизмом была наибольшей и составила 68,2% (рисунок 2А, таблица 1).

Уменьшение концентрации янтарной кислоты до 1,0 г/л в среде с рутином в концентрации 0,05 мг/л несколько снижало деструктивную активность бактерии до 39,5% (рисунок 2Г, таблица 1) и 45,58% (рисунок 2Б, таблица 1) в экспериментах 2 и 3 соответственно.

- в вариантах сред, содержащих янтарную кислоту (в концентрации 5,0 г/л) и рутин в различных концентрациях, наблюдалось снижение деструктивной активности штамма *M. gilvum* РАМ 1 по отношению к фенантрону параллельно с увеличением содержания флавоноида в среде культивирования. Так, рутин в концентрациях 0,05, 0,1 и 0,2 ммоль/л приводил к деструкции фенантрена на 68,21, 56,72 и 26,52% соответственно (рисунок 2А, таблица 1).

- в самой низкой используемой концентрации рутин совместно с янтарной кислотой (1,0 г/л) несущественно повышал деструктивную способность штамма *M. gilvum* РАМ 1 по отношению к фенантрону (32,9% в присутствии рутина по сравнению с 29,6 % без рутина). Однако с увеличением содержания флавоноида в среде культивирования наблюдалась стимуляция деструкции токсиканта микроорганизмом: рутин в концентрации 0,01 мМ увеличивал деструкцию фенантрена в среднем до 43,5% (рисунок 2Б, Г, таблица 1).

- внесение флавоноида морина в концентрации 0,01 ммоль/л в среду культивирования в присутствии янтарной кислоты (1,0 г/л) вызывало деструкцию фенантрена на 39,4% по отношению к исходному содержанию модельного токсиканта (рисунок 2Г, таблица 1).

- в вариантах сред, содержащих в качестве единственного растительного метаболита янтарную кислоту, в концентрации 1,0 г/л деструкция фенантрена составила в среднем 31,9% (рисунок 2Б, В, Г, таблица 1). В концентрации 5,0 г/л янтарная кислота способствовала деструкции поллютанта на 59,78% (рисунок 2А, таблица 1).

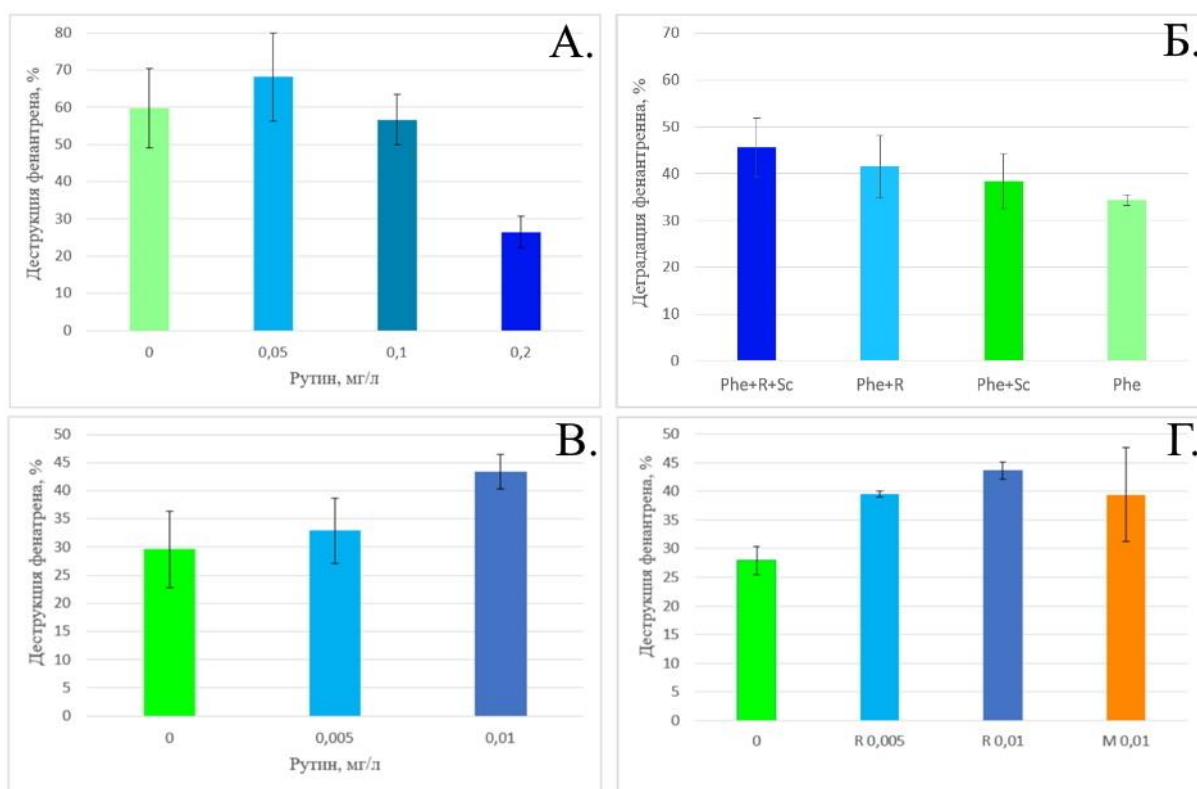


Рисунок 2 - Дегградация фенантрена в модельных условиях:

А - Влияние концентрации рутина на дегградацию фенантрена ризобактерией *M. gilvum* РАМ 1 на среде с янтарной кислотой; Б- Дегградация фенантрена ризобактерией *M. gilvum* РАМ1 на среде с рутином и янтарной кислотой: R – рутин (0,05 ммоль/л); Sc – янтарная кислота (5,0 г/л); Phe – фенантрен (0,2 г/л); В - Дегградация фенантрена ризобактерией *M. gilvum* РАМ1 на среде с янтарной кислотой (1,0 г/л) и рутином в различных концентрациях: 0,005 и 0,01 ммоль/л; Г - Дегградация фенантрена

ризобактерией *M. gilvum* PAM1 на среде с янтарной кислотой (1,0 г/л), рутином (0,005 и 0,01 ммоль/л) и морином (0,01 ммоль/л)

Таким образом, результаты, полученные в данной работе, демонстрируют стимулирующий эффект компонентов корневых экссудатов, представленных в различных концентрациях, и их синергии на деструктивную способность штамма *M. gilvum* PAM 1 по отношению к модельному токсиканту фенантрону.

Заключение: В настоящем исследовании в рамках технологии биоремедиации изучается влияние компонентов корневых экссудатов на деградацию полициклического ароматического углеводорода фенантрена ризосферным штаммом *Mycolicibacterium gilvum* PAM 1, что установлено для этого микроорганизма впервые.

В ходе данной работы было установлено, что компоненты корневых экссудатов оказывают стимулирующее влияние не только на ростовую, но и на деструкционную активность штамма *M. gilvum* PAM 1.

Установлено, что карбоновая кислота служила основным ростовым субстратом для микроорганизма, тогда как флавонолы и ПАУ, концентрации которых существенно меньше как в культуральной среде, так и в реальных условиях, не значительно влияли на рост бактерии. В отношении исследуемого микроорганизма рутин и морин не оказывали антимикробного действия, напротив, в сочетании с янтарной кислотой значительно увеличивали прирост биомассы. Полученный эффект предположительно был связан с участием рутина и морины как витаминов в активизации ферментов микробного метаболизма, что, вероятно, приводило к более полной ассимиляции углерода янтарной кислоты. Степень стимулирования микробной деструкции ПАУ различалась в зависимости от соотношения корневых экссудатов в среде культивирования. Рутин в высоких концентрациях (0,1 и 0,2 ммоль/л) в комплексе с сукцинатом ингибировал деградацию фенантрена, тогда как при концентрациях от 0,005 до 0,05

ммоль/л, напротив, стимулировал ее. Флавоноид морин оказывал меньшее влияние на деструкционную активность штамма по сравнению с рутином.

Таким образом, полученные результаты позволили показать зависимость эффективности микробной деградации ПАУ от присутствия, концентрации и сочетания компонентов корневых экссудатов растений. В целом, понимание взаимосвязей между биохимией растительных метаболитов, ризосферным сообществом микроорганизмов и судьбой органических загрязнителей имеет большое значение для биоремедиации - эффективной стратегии очистки загрязнителей сред, таких как полициклические ароматические углеводороды.

Выводы: 1. Обнаружено стимулирующее влияние компонентов корневых экссудатов – карбоновых кислот (на примере янтарной кислоты) и флавоноидов (на примере рутина и морина) на деградацию модельного токсиканта фенантрена штаммом *Mycolicibacterium gilvum* РАМ1. Деструкция была максимальной (68,2%) в варианте среды с рутином в концентрации 0,05 ммоль/л и янтарной кислотой в концентрации 5,0 г/л.

2. Установлено, что при увеличении содержания флавоноидов от 0,05 до 0,2 ммоль/л в среде культивирования происходит снижение деструктивной активности штамма *M. gilvum* РАМ 1.

3. Обнаружено стимулирующее влияние компонентов корневых экссудатов на ростовую активность ризосферной бактерии *M. gilvum* РАМ 1 в среде, содержащей модельный токсикант - фенантрен. Установлено, что янтарная кислота служила основным ростовым субстратом для бактерии, тогда как флавоноиды и ПАУ, незначительно влияли на рост микроорганизма. При концентрациях сукцината равных 1,0 г/л, наибольший прирост биомассы обеспечивал морин.

Список использованных источников

- 1 Garcés Mejía, A. C. Effect of secondary metabolites present in *Brassica nigra* root exudates on anthracene and phenanthrene degradation by

- rhizosphere microorganism / N. J. Pino, G. A. Penuela // Environmental Engineering Science. – 2018. – Vol. 35, N 3. – P. 203-209.
- 2 Bioremediation of polyaromatic hydrocarbons (PAHs) using rhizosphere technology / S. Bisht [et al.] // Brazilian Journal of Microbiology. – 2015. – Vol. 46, N 1. – P. 7-21.
- 3 Rhizoremediation as a green technology for the remediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soils / S. A. Hoang [et al.] // Journal of Hazardous Materials. – 2021. – Vol. 401: 123282.
- 4 Qui, X. Effects of plant flavonoids on the fate of polynuclear aromatic hydrocarbons in rhizosphere soil. – 2000. – P. 1-23.
- 5 Ite, A. E. The effect of flavonoids on the microbial mineralisation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil / A. E. Ite, K. T. Semple // International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation. – 2015. – Vol. 3, N 3. – P. 66-78.
- 6 Fletcher, J. S. Release of phenols by perennial plant roots and their potential importance in bioremediation / J. S. Fletcher, R. S. Hegde // Chemosphere. – 1995. – Vol. 31. – N 4. – P. 3009-3016.
- 7 *Mycolicibacterium* sp. strain PAM 1, an alfalfa rhizosphere dweller, catabolizes PAHs and promotes partner-plant growth / S. N. Golubev [et al.] // Microbiological Research. – 2021. – Vol. 253, N 8: 126885.
- 8 Plant–rhizosphere–microflora association during phytoremediation of PAH-contaminated soil / A. Y. Muratova [et al.] // International Journal of Phytoremediation. – 2003. – Vol. 5, N 2. – P. 137-151.
- 9 Campbell, C. D. Use of rhizosphere carbon sources in sole carbon source tests to discriminate soil microbial communities / C. D. Campbell, S. J. Grayston, D. J. Hirst // Journal of Microbiological Methods. – 1997. – Vol. 30, N 1. – P. 33-41.

