

Оригинальная статья

УДК 579.26:579.222

<https://doi.org/10.35885/1684-7318-2022-2-193-205>

ВЛИЯНИЕ КОМПОНЕНТОВ КОРНЕВЫХ ЭКССУДАТОВ РАСТЕНИЙ НА ДЕГРАДАЦИЮ ФЕНАНТРЕНА РИЗОБАКТЕРИЕЙ *MYCOLICIBACTERIUM GILVUM* (MYCOBACTERIACEAE, ACTINOBACTERIA)

Л. В. Панченко ^{1✉}, Д. А. Кузянов ², Е. В. Плешакова ²,
Н. Н. Позднякова ¹, А. Ю. Муратова ¹, О. В. Турковская ¹

¹ Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов,
ФИЦ «Саратовский научный центр РАН»

Россия, 410049, г. Саратов, просп. Энтузиастов, д. 13

² Саратовский национальный исследовательский государственный университет
имени Н. Г. Чернышевского

Россия, 410012, г. Саратов, ул. Астраханская, д. 83

Поступила в редакцию 26.01.2022 г., после доработки 22.02.2022 г., принята 27.02.2022 г.

Аннотация. Исследовано влияние мажорных компонентов корневых экссудатов – карбоновых кислот (на примере янтарной кислоты) и представителей вторичных растительных метаболитов фенольной природы – флавоноидов (на примере флавонола рутина) на микробную деградацию трехкольцевого полициклического ароматического углеводорода (ПАУ) фенантрена ризобактерией *Mycolicibacterium gilvum*. Деструктивную активность микроорганизмов по отношению к ПАУ изучали, культивируя их в жидкой минеральной среде, содержащей фенантрен (0.2 г/л), янтарную кислоту (5 г/л) и рутин в концентрациях 0, 0.05, 0.1 и 0.2 ммоль/л при 30°C в условиях аэрации на качалке (130 об./мин) в течение 14 сут. Проведенное исследование показало стимулирующее действие янтарной кислоты и рутина на микробную деградацию фенантрена. Установлено, что карбоксилат служил основным ростовым субстратом для микроорганизма, тогда как флавонол и ПАУ незначительно влияли на рост бактерии. В отношении исследуемого микроорганизма рутин не оказывал антимикробного действия, напротив, в сочетании с янтарной кислотой значительно увеличивал прирост биомассы. В высоких концентрациях (0.1 и 0.2 ммоль/л) рутин ингибировал деградацию фенантрена, которая снижалась на 22 и 56% соответственно. Однако в концентрации 0.05 ммоль/л рутина, напротив, увеличивал ее на 10%. Таким образом, полученные результаты позволили показать зависимость эффективности микробной деградации ПАУ от присутствия, сочетания и концентрации компонентов корневых экссудатов растений.

Ключевые слова: корневые экссудаты, рутин, янтарная кислота, ризобактерии, микробная деградация, фенантрен

✉ Для корреспонденции. Лаборатория экологической биотехнологии Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН.

ORCID и e-mail адреса: Панченко Леонид Владимирович: <https://orcid.org/0000-0003-4949-4163>, panchenko_l@ibppm.ru; Кузянов Дмитрий Андреевич: dimakuzyanov2000@gmail.com; Плешакова Екатерина Владимировна: <https://orcid.org/0000-0003-3836-0258>, plekat@yandex.ru; Позднякова Наталия Николаевна: <https://orcid.org/0000-0002-0505-4628>, pozdneyakova_n@ibppm.ru; Муратова Анна Юрьевна: <https://orcid.org/0000-0003-927-918X>, muratova_a@ibppm.ru; Турковская Ольга Викторовна: <https://orcid.org/0000-0003-4501-4046>, turkovskaya_o@ibppm.ru.

© Панченко Л. В., Кузянов Д. А., Плешакова Е. В., Позднякова Н. Н., Муратова А. Ю., Турковская О. В., 2022

Финансирование. Работа выполнена в рамках госзадания Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов – ФИЦ «Саратовский научный центр РАН» (№ 121031700141-7) и с использованием Коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН (<http://collection.ibppm.ru>) г. Саратов.

Для цитирования. Панченко Л. В., Кузянов Д. А., Плешакова Е. В., Позднякова Н. Н., Муратова А. Ю., Турковская О. В. Влияние компонентов корневых экссудатов растений на деградацию фенантрена ризобактерией *Mycolicibacterium gilvum* (Mycobacteriaceae, Actinobacteria) // Поволжский экологический журнал. 2022. № 2. С. 193 – 205. <https://doi.org/10.35885/1684-7318-2022-2-193-205>

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день полициклические ароматические углеводороды (ПАУ) признаны приоритетными загрязняющими веществами, попадающими в окружающую среду в результате естественных процессов, а также антропогенной деятельности. Вредные свойства ПАУ, такие как высокая токсичность, мутагенность и канцерогенность, а также их устойчивость к биологическому разложению и способность к биоаккумуляции сделали ремедиацию загрязненных ими сред крайне важной задачей (Augulyte et al., 2008). В настоящее время доступны различные физические и химические методы очистки от ПАУ, такие как сжигание, ультразвуковая обработка, экстракция растворителем и т.д. (Vidonish et al., 2016). Однако у этих технологий есть несколько недостатков: нормативная нагрузка, стоимость, сложность, а иногда и неэффективность полного удаления соединений. Улучшить эффективность очистки позволяет применение экологически безопасных методов, к которым относятся технологии биологической ремедиации, использующие для восстановления природных объектов жизнедеятельность микроорганизмов и растений, играющих ведущую роль в деградации ПАУ в окружающей среде (Peng et al., 2018).

К настоящему времени выделено и описано немало микроорганизмов-деструкторов ПАУ (Shahsavari et al., 2019), однако многочисленные факторы, влияющие на биодеградацию этих соединений, изучены недостаточно и продолжают активно исследоваться. В частности, рядом исследователей показано селективное действие некоторых растений на формирование ризосферного микробного сообщества, разрушающего ПАУ-загрязнителя эффективнее в сравнении с другими растениями (Bourceret et al., 2018). Предположительно решающее значение для формирования активного сообщества ПАУ-деструкторов имеет специфический состав корневых выделений этих растений. Водорастворимые компоненты корневых экссудатов, такие как карбоновые кислоты, углеводы и аминокислоты, являются легкодоступными источниками углерода и энергии для ризосферных микроорганизмов, оказывающими влияние на их жизнедеятельность и деструкцию углеводородов (Schwab, Banks, 1994; Yoshitomi, Shann, 2001). С точки зрения R. S. Negde и J. S. Fletcher (1996), корни растений следует рассматривать как «тесно переплетенную, биологически обусловленную систему подачи кометаболита», необходимого для микробной деградации загрязнителя. С другой стороны, такие вторичные метаболиты растений, как фенольные соединения и, в частности, флавоноиды, также являются важными и специфическими компонентами корневых экссудатов

(Weston, Mathesius, 2013). Структурное подобие этих соединений некоторым поллютантам (например, ПАУ) может предполагать их влияние на интенсивность ризодеградации загрязнителей (Siciliano, Germida, 1998; Mejia et al., 2018). Понимание взаимосвязей между биохимией корневых экссудатов растений, ризосферным микробным сообществом и судьбой органических загрязнителей имеет значение для успешного применения фиторемедиации.

Целью представленных исследований являлась оценка влияния компонентов корневых экссудатов растений янтарной кислоты и флавоноида рутина на рост и биодеградацию ПАУ ризобактерией *Mycolicibacterium gilvum* PAM1.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В работе использовали микробный штамм PAM 1, относящийся к виду *Mycolicibacterium gilvum* (Stanford and Gunthorpe 1971) Gupta et al., 2018, выделенный сотрудниками лаборатории экологической биотехнологии Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН (г. Саратов) как деструктор ПАУ из ризосферы люцерны посевной (*Medicago sativa* L.), выращенной в нефтезагрязненной почве (Golubev et al., 2021). Штамм включен в коллекцию ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН под коллекционным номером IBPPM 589.

Микроорганизм выращивали в 0.1 л колбах Эрленмейера в условиях аэрации на орбитальном шейкере при 130 об./мин и температуре 30°C в течение 14 сут. в 50 мл минеральной среды 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 (Muratova et al., 2003); раствор микроэлементов – 1 мл. 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.

Оценку роста и деградиативной активности штамма *M. gilvum* PAM 1 по отношению к ПАУ проводили в присутствии янтарной кислоты (5.0 г/л) или без нее, с добавлением фенантрена в концентрации 0.2 г/л и/или с добавлением рутина. Влияние рутина на деградацию ПАУ оценивали, внося флавоноид в среду в различных концентрациях (0.05; 0.1 и 0.2 ммоль/л) в зависимости от задач эксперимента. Все эксперименты проводили в трех повторностях.

Для засева подготовленной среды использовали биомассу 3-суточной культуры штамма *M. gilvum* PAM1, полученной на агаризованной среде LB (Bertani, 1951). Микробную биомассу собирали с поверхности агаризованной среды, суспендировали и отмывали в физрастворе. Среду в колбах инокулировали необходимым количеством микробной суспензии до получения значения оптической плотности 0.5 ед., определяемой турбидиметрически в 1-сантиметровых кварцевых кюветах на фотоколориметре КФК-2 (ЗОМЗ, Россия) при длине волны 440 нм. Рост микробного штамма *M. gilvum* PAM1 в процессе культивирования оценивали по изменению оптической плотности культуральной жидкости при тех же условиях (D_{440} , КФК-2).

Остаточное содержание фенантрена и рутина в среде после культивирования микроорганизма определяли методом ВЭЖХ. Для этого проводили экстракцию

фенантрена из полного объема культуральной среды 5 мл хлороформа в течение 10 мин на шейкере, процедуру повторяли трижды. Все экстракты объединяли, высушивали и перерастворяли в 1 мл ацетонитрила для дальнейшего анализа. После экстракции фенантрена по 2 мл культуральной среды отбирали в центрифужные пробирки Eppendorf и центрифугировали при 9000 об./мин при температуре +4°C в течение 10 мин для осаждения клеток, после чего отбирали по 1 мл супернатанта для последующего анализа.

ВЭЖХ анализ содержания фенантрена и рутина в среде проводили на хроматографе Agilent Technologies 1220 Infinity II LC (USA). Рутин определяли с использованием колонки ZORBAX Eclipse Plus C18 4.6×150 мм 5-Micron, UV-детектора 254 нм. Хроматографирование проводили в системе растворителей: А (H₂O pH 2.5 (H₃PO₄)) и В: ацетонитрил, линейный градиент 40 – 100% В, 15 мин. Фенантрен определяли с использованием колонки ZORBAX Eclipse PAK 4.6×150 мм 5-Micron, UV-детектора 254 нм. Хроматографирование проводили в системе растворителей: А (H₂O) и В: ацетонитрил, линейный градиент 40 – 100% В, 15 мин.

Деструктивную активность микроорганизма по отношению к ПАУ и рутину выражали в процентах снижения начальной концентрации этих соединений.

Все полученные экспериментальные данные подвергали статистической обработке. Для этого полученные цифровые значения проверяли на нормальность распределения по критерию Колмогорова – Смирнова. Сравнение средних проводили с использованием теста Фишера и показателя наименьшей существенной разницы ($P \leq 0.05$) в однофакторном анализе дисперсии (ANOVA). Для обработки и анализа данных использовали пакет STATISTICA 13.0 (TIBCO Software Inc. 2017, Statsoft Russia).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для определения влияния компонентов корневых выделений карбоновых кислот и флавоноидов, а также поллютанта на рост *M. gilvum* PAM 1 проводили культивирование микроорганизма в жидкой среде с добавлением янтарной кислоты, рутин и фенантрена в качестве единственных источников углерода и энергии и в различных сочетаниях. Результаты представлены на рис. 1, 2.

Вид *M. gilvum* относится к сравнительно быстрорастущим микобактериям, однако, как и другие представители семейства Mycobacteriaceae, характеризуется довольно продолжительными лаг-фазой и фазой экспоненциального роста, в связи с чем отличия между вариантами опыта были видны лишь после 3 сут. культивирования (см. рис. 1).

Значительный рост культуры наблюдался только на среде с янтарной кислотой. Через 14 сут. культивирования внесенная в среду в качестве единственного источника углерода и энергии янтарная кислота увеличивала прирост микробной биомассы *M. gilvum* PAM 1 в 4 раза относительно исходной посевной дозы. Добавление фенантрена в качестве ко-субстрата несколько снижало, но не ингибировало рост штамма *M. gilvum* PAM1 – прирост биомассы увеличился в 3.5 раза. Известно, что органические кислоты активно метаболизируются микроорганизмами, как в культуральной среде, так и в почве, при этом 60% субстрата минерализуется до

CO₂, а 40% – аккумулируется в растущую клеточную биомассу (Jones et al., 1994, 1996). Степень биodeградации органических кислот в ризосферной почве очень высока. Они быстро и полностью метаболизируются ризосферной микробиотой, демонстрируя свой биостимулирующий потенциал (Macías-Benitez et al., 2020). В присутствии фенантрена рост штамма *M. gilvum* PAM1 несколько снижался (на 19%), что может быть связано с одновременным использованием ПАУ, который при этом поддерживал рост микроорганизма слабее, чем янтарная кислота. Способность штамма *M. gilvum* PAM1 трансформировать и использовать ПАУ для своего роста была описана нами ранее (Golubev et al., 2021). Помимо фенантрена PAM1 также может разрушать антрацен, флуорен, флуорантен и пирен. Утилизируемые штаммом PAM1 ПАУ-субстраты являются типичными для микобактериальных деструкторов (Kim et al., 2010; Brzeszcz, Kaszycki, 2018), однако скорость деградации ПАУ и роста на них у микобактерий и этого штамма, в частности, невысока (Golubev et al., 2021).

Несмотря на входящий в состав рутина дисахарид рутинозу, флавонол практически не поддерживал рост микроорганизма, вероятно, по причине его низкой используемой концентрации (см. рис. 1). Данные о микробной деградации рутина немногочисленны. Описана его микробная биотрансформация в кверцетин в результате гидролиза под действием бактериальных α-рамнозидаз и β-глюкозидаз для представителей

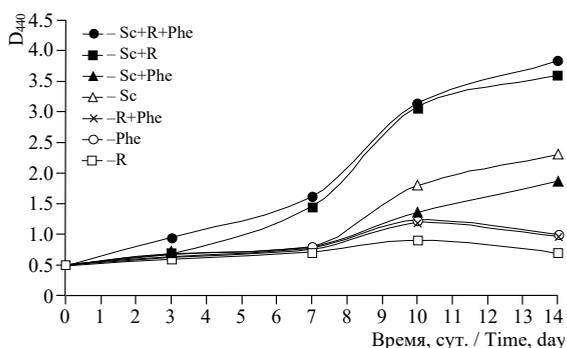


Рис. 1. Влияние фенантрена, рутина и янтарной кислоты на рост *M. gilvum* PAM 1 в жидкой минеральной среде: R – рутин (0.05 ммоль/л); Sc – янтарная кислота (5.0 г/л); Phe – фенантрен (0.2 г/л)

Fig. 1. Effect of phenanthrene, rutin, and succinic acid on the growth of *M. gilvum* PAM 1 in our liquid mineral medium: R, rutin (0.05 mmol/L); Sc, succinic acid (5.0 g/L); Phe, phenanthrene (0.2 g/L)

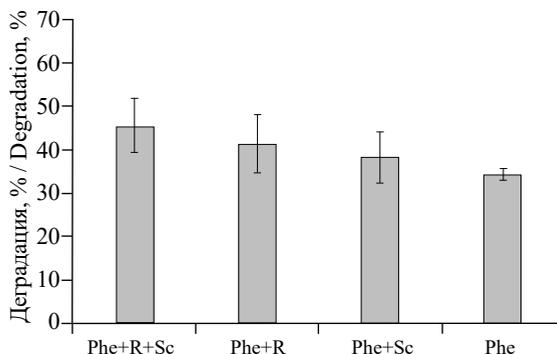


Рис. 2. Деградация фенантрена ризобактерией *M. gilvum* PAM1 на среде с рутином и янтарной кислотой: R – рутин (0.05 ммоль/л); Sc – янтарная кислота (5.0 г/л); Phe – фенантрен (0.2 г/л)

Fig. 2. Phenanthrene degradation by rhizobacterium *M. gilvum* PAM1 in the medium supplemented with rutin and succinic acid: R, rutin (0.05 mmol/L); Sc, succinic acid (5.0 g/L); Phe, phenanthrene (0.2 g/L)

кишечной микрофлоры, включая *Lactobacillus* spp., *Bacteroides* spp. и *Bifidobacterium* spp. (Tuyishime et al., 2018). Однако упоминаний о какой-либо способности к биотрансформации рутина у микобактерий, к которым относится и род *Mycobacterium*, не обнаружено. При этом есть сведения о высокой антимикробной активности рутина, выделенного из софоры японской, в отношении *Mycobacterium smegmatis* (Rym et al., 1996). Известно, что флавоноиды, в том числе и рутин, обладают различными биологически активными эффектами, включающими и антибактериальное действие, что неоднократно описано в литературе (Cushnie, Lamb, 2005; Wang et al., 2021), а спектр микроорганизмов, в отношении которых этот флавоноид проявляет его, достаточно широк и включает в себя таких представителей, как *Bacillus cereus*, *Salmonella enteritidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus luteus*, *Klebsiella pneumoniae* и *Escherichia coli* (Danciu et al., 2018; Al-Majmaie et al., 2019). Предполагается, что мишенью антибактериального действия рутина является клеточная мембрана (Al-Majmaie et al., 2019), кроме того, антибактериальное действие этого флавоноида связывают с селективным ингибированием топоизомеразы (Cushnie, Lamb, 2005). В нашем исследовании добавление 0.05 ммоль/л рутина в сочетании с фенантреном не вызывало ингибирование роста *M. gilvum* PAM1, а добавление рутина в среду культивирования, содержащую в качестве источника углерода янтарную кислоту, вдвое увеличивало прирост биомассы ризобактерии. Таким образом, сочетанное присутствие двух компонентов корневых экссудатов (карбоновой кислоты и флавоноида) в среде обеспечивало максимальный рост ризосферного штамма-деструктора *M. gilvum* PAM1, а внесение фенантрена не ингибировало его (см. рис. 1). Предположительно, рутин, выступая как витамин, стимулировал активность ферментов микробного метаболизма, что и обеспечивало такой прирост микробной биомассы.

Через 14 сут. фенантрен (0.2 г/кг) подвергался деградации как в присутствии янтарной кислоты и рутина, так и без них (см. рис. 2). В качестве единственного источника углерода и энергии фенантрен разрушался на 34%, тогда как при добавлении в среду янтарной кислоты или рутина по отдельности наблюдалась тенденция к стимулированию его деградации. Совместное внесение рутина и янтарной кислоты достоверно повышало деградацию фенантрена до максимального значения в этом эксперименте – до 46%. Таким образом, полученные результаты продемонстрировали стимулирующее влияние компонентов корневых экссудатов на микробную деградацию ПАУ. О подобном положительном влиянии корневых экссудатов, содержащих вторичные растительные метаболиты, достаточно много сообщений (Yoshitomi, Shann, 2001; Schwab et al., 1994; Kuiper et al., 2002; Mejia et al., 2018). Особый интерес в этом вопросе представляет собой роль ароматических компонентов корневых выделений, а именно фенолов и флавоноидов, чья массовая доля в экссудатах значительно меньше, но влияние которых на деградацию ПАУ может быть значительным, учитывая химическое структурное сходство с поллютантом. Отмечается, что многие флавоноиды под действием монооксигеназ и/или диоксигеназ, так же, как и ПАУ, биотрансформируются до эпоксидов и диолов (Qiu et al., 2004). Так, С. S. Ely и В. F. Smets (2017) полагают, что такие фенольные

соединения, как морин, кофейная и протокатеховая кислоты, по-видимому, связаны с бактериальной деградацией 3- и 4-кольцевых ПАУ в ризосфере. С использованием флавона, морингидрата и 3-гидрокси-флавона А. Е. Ite и К. Т. Semple (2015) показали повышенную микробную минерализацию ^{14}C -ПАУ в искусственно свежезасеянных почвах с добавлением 50 – 100 мкг/кг флавоноидов. Авторы высказывают предположение, что в зависимости от своей биодоступной концентрации и растворимости флавоноиды могут либо стимулировать, либо ингибировать минерализацию ПАУ в почве местными микробными сообществами. Значение концентрации флавоноидов для микробной деградации ПАУ отмечается также в работе X. Qiu с соавторами (2004), где было установлено, что добавление морина (природный гидроксильированный флавоноид) и флавона (синтетический негидроксильированный флавоноид) в концентрациях более 10 ммоль/л препятствовало минерализации ^{14}C -бенз(а)пирена в почвенных суспензиях корневой зоны. L. Lu с соавторами (2019) также отметил, что скорость удаления ПАУ бактерией *Methylobacterium extorquens* C1 увеличивалась в присутствии низких концентраций фиталексинов.

Для изучения влияния концентрации рутина на биodeградацию ПАУ на основании данных литературы были определены три концентрации флавоноида (0.05, 0.1 и 0.2 ммоль/л), с которыми проводили дальнейшие эксперименты. При анализе учитывали рост культуры и снижение концентрации ПАУ в среде культивирования. Результаты представлены на рис. 3, 4.

Установлено, что на среде для деструкторов ПАУ с янтарной кислотой (5 г/л) на рост в присутствии рутина или сочета-

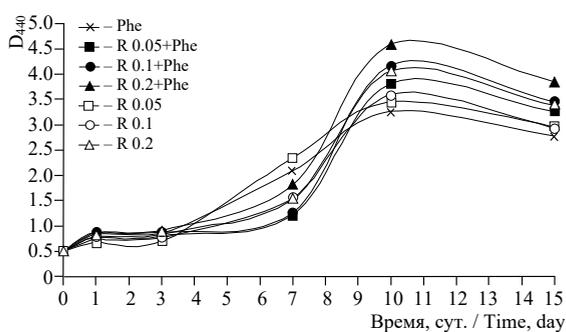


Рис. 3. Влияние концентрации рутина на рост штамма *M. gilvum* PAM 1 на среде с фенантреном и янтарной кислотой: R – рутин; Phe – фенантрен (0.2 г/л)

Fig. 3. Effect of rutin concentration on the growth of *M. gilvum* PAM 1 in the medium supplemented with phenanthrene and succinic acid: R, rutin; Phe, phenanthrene (0.2 g/L)

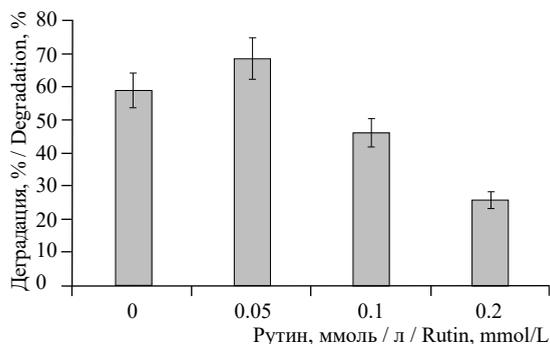


Рис. 4. Влияние концентрации рутина на деградацию фенантрена ризобактерией *M. gilvum* PAM 1 на среде с янтарной кислотой

Fig. 4. Effect of rutin concentration on phenanthrene degradation by rhizobacterium *M. gilvum* PAM 1 in the medium supplemented with succinic acid

ния фенантрена с рутином влияла концентрация флавоноида (см. рис. 3). В обоих случаях рост был тем больше, чем большей была концентрация рутина: 0.05, 0.1 или 0.2 ммоль/л.

Интенсивность деградации фенантрена штаммом *M. gilvum* PAM1 также зависела от используемой концентрации рутина в среде (см. рис. 4). Установлено, что в отсутствие рутина штамм *M. gilvum* PAM1 подвергал деградации 59% фенантрена за 14 сут. Добавление рутина в минимальной концентрации (0.05 ммоль/л), наиболее приближенной к реальному содержанию флавоноидов в корневых выделениях, приводило к увеличению деструкции фенантрена на 10%. Однако дальнейшее повышение концентрации рутина приводило к угнетению деградации ПАУ. Так, при концентрации рутина 0.1 и 0.2 ммоль/л деградация фенантрена снижалась до 46 и 26% (т.е. на 22 и 56%) соответственно (см. рис. 4).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Биодеградация органических загрязнителей в ризосфере растений происходит в присутствии корневых выделений, которые могут оказывать значительное влияние, как на рост, так и на активность почвенной микрофлоры. Экссудаты имеют сложный состав, и их отдельные компоненты могут по-разному влиять на метаболизм ризосферных микроорганизмов-деструкторов. Проведенное исследование продемонстрировало стимулирующее действие основных компонентов корневых экссудатов – карбоновых кислот (на примере янтарной кислоты) и флавоноидов (на примере флавонола рутина) – на микробную деградацию трехкольцевого ПАУ фенантрена ризобактерией *Mycolicibacterium gilvum*. Установлено, что карбоновая кислота служила основным ростовым субстратом для микроорганизма, тогда как флавонол 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 не оказывал антимикробного действия, напротив, в сочетании с янтарной кислотой значительно увеличивал прирост биомассы. Полученный эффект предположительно был связан с участием рутина как витамина в активизации ферментов микробного метаболизма, что, вероятно, приводило к более полной ассимиляции углерода янтарной кислоты. В высоких концентрациях (0.1 и 0.2 ммоль/л) рутин ингибировал деградацию фенантрена, тогда как при 0.05 ммоль/л, напротив, стимулировал ее.

Таким образом, полученные результаты позволили показать зависимость эффективности микробной деградации ПАУ от присутствия, концентрации и сочетания компонентов корневых экссудатов растений. Для более строгой характеристики влияния растительных метаболитов (включая вторичные) на биодеградацию ПАУ предполагается провести исследования с более широким спектром как карбоновых кислот, так и флавоноидов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Al-Majmaie S., Nahar L., Sharples G. P., Wadi K., Sarker S. D. Isolation and antimicrobial activity of rutin and its derivatives from *Ruta chalepensis* (Rutaceae) growing in Iraq // *Records of Natural Products*. 2019. Vol. 13, № 1. P. 64 – 70. <https://doi.org/10.25135/rnp.74.18.03.250>

Augulyte L., Kliugaite D., Racys V., Jankunaite D., Zaliauskiene A., Andersson P. L., Bergqvist P. A. Chemical and ecotoxicological assessment of selected biologically activated sorbents for treating wastewater polluted with petroleum products with special emphasis on polycyclic aromatic hydrocarbons // *Water, Air, & Soil Pollution*. 2008. Vol. 195, iss. 1 – 4. P. 243 – 256. <https://doi.org/10.1007/s11270-008-9743-7>

Bertani G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli* // *Journal of Bacteriology*. 1951. Vol. 62, № 3. P. 293 – 300. <https://doi.org/10.1128/jb.62.3.293-300.1951>

Bourceret A., Leyval C., Faur P., Lorgeoux C., Cebron A. High PAH degradation and activity of degrading bacteria during alfalfa growth where a contrasted active community developed in comparison to unplanted soil // *Environmental Science and Pollution Research*. 2018. Vol. 25, iss. 29. P. 29556 – 29571. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2744-1>

Brzeszcz J., Kaszycki P. Aerobic bacteria degrading both n-alkanes and aromatic hydrocarbons : An undervalued strategy for metabolic diversity and flexibility // *Biodegradation*. 2018. Vol. 29, iss. 4. P. 359 – 407. <https://doi.org/10.1007/s10532-018-9837-x>

Ely C. S., Smets B. F. Bacteria from wheat and cucurbit plant roots metabolize PAHs and aromatic root exudates : Implications for rhizodegradation // *International Journal of Phytoremediation*. 2017. Vol. 19, iss. 10. P. 877 – 883. <https://doi.org/10.1080/15226514.2017.1303805>

Cushnie T. P., Lamb A. J. Antimicrobial activity of flavonoids // *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2005. Vol. 26, iss. 5. P. 343 – 356. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2005.09.002>

Danciu C., Pinzaru I. A., Dehelean C. A., Hancianu M., Zupko I., Navolan D., Licker M., Ghiulai R. M., Șoica C. M. Antiproliferative and antimicrobial properties of pure and encapsulated rutin // *Farmacia*. 2018. Vol. 66, № 2. P. 302 – 308.

Golubev S. N., Muratova A. Yu., Panchenko L. V., Shchyogolev S. Yu., Turkovskaya O. V. *Mycolicibacterium* sp. strain PAM1, an alfalfa rhizosphere dweller, catabolizes PAHs and promotes Partner-plant Growth // *Microbiological Research*. 2021. Vol. 253, iss. 8. Article number 126885. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126885>

Hegde R. S., Fletcher J. S. Influence of plant growth stage and season on the release of root phenolics by mulberry as related to development of phytoremediation technology // *Chemosphere*. 1996. Vol. 32, iss. 12. P. 2471 – 2479. [https://doi.org/10.1016/0045-6535\(96\)00144-0](https://doi.org/10.1016/0045-6535(96)00144-0)

Ite A. E., Semple K. T. The Effect of Flavonoids on the microbial mineralisation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil // *International Journal of Environmental Bioremediation and Biodegradation*. 2015. Vol. 3, iss. 3. P. 66 – 78. <https://doi.org/10.12691/ijebb-3-3-1>

Jones D. L., Darrah P. R. Role of root derived organic-acids in the mobilization of nutrients from the rhizosphere // *Plant and Soil*. 1994. Vol. 166, iss. 2. P. 247 – 257. <https://doi.org/10.1007/BF00008338>

Jones D. L., Prabowo A. M., Kochian L. V. Kinetics of malate transport and decomposition in acid soils and isolated bacterial populations – the effect of microorganisms on root exudation of malate under al stress // *Plant and Soil*. 1996. Vol. 182, iss. 2. P. 239 – 247.

Kim S. J., Kweon O., Cerniglia C. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by mycobacterium strains // *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology* / ed. K. N. Timmis. Berlin ; Heidelberg : Springer, 2010. P. 1865 – 1879.

Kuiper I., Kravchenko L. V., Bloemberg G. V., Lugtenberg B. J. J. *Pseudomonas putida* strain PCL 1444, selected for efficient root colonization and naphthalene degradation, effectively utilizes root exudate components // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2002. Vol. 15, № 7. P. 734 – 741. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2002.15.7.734>

Lu L., Chai Q., He Sh., Yang Ch., Zhang D. Effects and mechanisms of phytoalexins on the removal of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by an endophytic bacterium isolated from ryegrass // *Environmental Pollution*. 2019. Vol. 253. P. 872 – 881. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.07.097>

Macias-Benitez S., Garcia-Martinez A. M., Caballero Jimenez P., Gonzalez J. M., Tejada Moral T., Parrado Rubio J. Rhizospheric organic acids as biostimulants: monitoring feedbacks on soil microorganisms and biochemical properties // *Frontiers in Plant Science*. 2020. Vol. 11. Article number 633. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00633>

Mejia A. C. G., Pino N. J., Peñuela G. A. Effect of secondary metabolites present in *Brassica nigra* root exudates on anthracene and phenanthrene degradation by rhizosphere microorganism // *Environmental Engineering Science*. 2018. Vol. 35, iss. 3. P. 203 – 209. <https://doi.org/10.1089/ees.2017.0156>

Muratova A., Hübner Th., Tisher S., Turkovskaya O., Möder M., Kusch P. Plant – rhizosphere-microflora association during phytoremediation of PAH-contaminated soil // *International Journal of Phytoremediation*. 2003. Vol. 5, iss. 2. P. 137 – 151. <https://doi.org/10.1080/713610176>

Peng X., Xu P. F., Du H., Tang Y., Meng Y., Yuan L., Sheng L. P. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons: A review // *Applied Ecology and Environmental Research*. 2018. Vol. 16, № 5. P. 6419 – 6440. https://doi.org/10.15666/aeer/1605_64196440

Qiu X., Reed B. E., Viadero R. C. Effects of flavonoids on 14C(7,10)-benzo(a)pyrene degradation in root zone soil // *Environmental Engineering Science*. 2004. Vol. 21, № 5. P. 637 – 646. <https://doi.org/10.1089/ees.2004.21.637>

Rym K. H., Eo S. K., Kim Y. S., Lee C. K., Han S. S. Antimicrobial activity and acute toxicity of natural rutin // *Korean Journal Pharmacognosy*. 1996. Vol. 27, № 4. P. 309 – 315.

Schwab A. P., Banks M. K. Biologically mediated dissipation of polyaromatic hydrocarbons in the root zone // *Bioremediation through Rhizosphere Technology* / eds. T. A. Anderson, J. R. Coats. Washington : American Chemical Society, 1994. P. 132 – 141. <https://doi.org/10.1021/BK-1994-0563.CH012>

Shahsavari E., Schwarz A., Aburto-Medina A., Ball A. S. Biological degradation of polycyclic aromatic compounds (PAHs) in soil : A current perspective // *Current Pollution Reports*. 2019. Vol. 5, iss. 3. P. 84 – 92. <https://doi.org/10.1007/s40726-019-00113-8>

Siciliano S. D., Germida J. J. Mechanisms of phytoremediation : Biochemical and ecological interactions between plants and bacteria // *Environmental Reviews*. 1998. Vol. 6, № 1. P. 65 – 79. <https://doi.org/10.1139/a98-005>

Tuyishime M. A., Harimana Y., Sun J. Biotransformation of rutin to quercetin by human gut bacteria and its effect on rutin bioavailability // *Research Inventy*. 2018. Vol. 8, iss. 2. P. 11 – 17.

Vidonish J. E., Zygourakis K., Masiello C. A., Sabadell G., Pedro J. J., Alvarez P. J. J. Thermal treatment of hydrocarbon-impacted soils: A review of technology innovation for sustainable remediation // *Engineering*. 2016. Vol. 2, iss. 4. P. 426 – 437. <https://doi.org/10.1016/J.ENG.2016.04.005>

Wang Z., Ding Z., Li Z., Ding Y., Jiang F., Liu J. Antioxidant and antibacterial study of 10 flavonoids revealed rutin as a potential anti-biofilm Agent in *Klebsiella Pneumoniae* strains isolated from hospitalized patients // *Microbial Pathogenesis*. 2021. Vol. 159. Article number 105121. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.105121>

Weston L. A., Mathesius U. Flavonoids : Their structure, biosynthesis and role in the rhizosphere, including allelopathy // *Journal of Chemical Ecology*. 2013. Vol. 39, iss. 2. P. 283 – 297. <https://doi.org/10.1007/s10886-013-0248-5>

Yoshitomi K. J., Shann J. R. Corn (*Zea mays* L.) root exudates and their impact on 14C-pyrene mineralization // *Soil Biology and Biochemistry*. 2001. Vol. 33, iss. 12 – 13. P. 1769 – 1776. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(01\)00102-X](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(01)00102-X)

Effect of plant root exudate constituents on the degradation of phenanthrene by rhizobacterium *Mycolicibacterium gilvum* (Mycobacteriaceae, Actinobacteria)

L. V. Panchenko ^{1✉}, **D. A. Kuzyanov** ², **Ye. V. Pleshakova** ²,
N. N. Pozdnyakova ¹, **A. Yu. Muratova** ¹, **O. V. Turkovskaya** ¹

¹ Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms
of Russian Academy of Sciences

13 Prospect Entuziastov, Saratov 410049, Russia

² Saratov State University

83 Astrakhanskaya St., Saratov 410012, Russia

Received: 26 January 2022 / revised: 22 February 2022 / accepted: 27 February 2022

Abstract. The influence of the major components of plant root exudates, namely, carboxylic acids (succinic acid as an example) and secondary plant phenolic metabolites – flavonoids (rutin as an example), on the microbial degradation of the three-ring polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) phenanthrene by rhizobacterium *Mycolicibacterium gilvum* was studied. The destructive activity of this microorganism relative to PAH was studied by cultivating it in a liquid mineral medium containing phenanthrene (0.2 g/L), succinic acid (5 g/L), and rutin (0, 0.05, 0.1 or 0.2 mmol/L) at 30°C under aeration on a shaker (130 rpm) for 14 days. The stimulating effect of succinic acid and rutin on the microbial degradation of phenanthrene was revealed. It was found that carboxylate was utilized as the main growth substrate for the microorganism, while flavonol and PAH had little effect on bacterial growth. Rutin had no antimicrobial effect on the microorganisms studied; on the contrary, in combination with succinic acid, it significantly increased the biomass growth. At high concentrations (0.1 and 0.2 mmol/L), rutin inhibited the degradation of phenanthrene by 22 and 56%, respectively. However, at a concentration of 0.05 mmol/L rutin increased phenanthrene degradation by 10%. Thus, the results obtained showed the dependence of the PAH microbial degradation efficiency on the presence, combination, and concentration of the plant root exudate constituents.

Keywords: plant root exudates, rutin, succinic acid, rhizobacteria, microbial degradation, phenanthrene

Funding. This work was carried out under research theme No. 121031700141-7 of the Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Saratov Scientific Centre of the Russian Academy of Sciences, and using the Collection of Rhizospheric Microorganisms of the IBPPM RAS (<http://collection.ibppm.ru>) Saratov, Russia.

For citation: Panchenko L. V., Kuzyanov D. A., Pleshakova Ye. V., Pozdnyakova N. N., Muratova A. Yu., Turkovskaya O. V. Effect of plant root exudate constituents on the degradation of phenanthrene by rhizobacterium *Mycolicibacterium gilvum* (Mycobacteriaceae, Actinobacteria). *Povolzhskiy Journal of Ecology*, 2022, no. 2, pp. 193–205 (in Russian). <https://doi.org/10.35885/1684-7318-2022-2-193-205>

✉ *Corresponding author.* Laboratory of Ecological Biotechnology of Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Russia.

ORCID and e-mail addresses: Leonid V. Panchenko: <https://orcid.org/0000-0003-4949-4163>, panchenko_l@ibppm.ru; Dmitry A. Kuzyanov: dimakuzyanov2000@gmail.com; Yekaterina V. Pleshakova: <https://orcid.org/0000-0003-3836-0258>, plekat@yandex.ru; Natalia N. Pozdnyakova: <https://orcid.org/0000-0002-0505-4628>, pozdnyakova_n@ibppm.ru; Anna Yu. Muratova: <https://orcid.org/0000-0003-927-918X>, muratova_a@ibppm.ru; Olga V. Turkovskaya: <https://orcid.org/0000-0003-4501-4046>, turkovskaya_o@ibppm.ru.

REFERENCES

- Al-Majmaie S., Nahar L., Sharples G. P., Wadi K., Sarker S. D. Isolation and antimicrobial activity of rutin and its derivatives from *Ruta chalepensis* (Rutaceae) growing in Iraq. *Records of Natural Products*, 2019, vol. 13, no. 1, pp. 64–70. <https://doi.org/10.25135/rnp.74.18.03.250>
- Augulyte L., Kliugaite D., Racys V., Jankunaite D., Zaliauskiene A., Andersson P. L., Bergqvist P. A. Chemical and ecotoxicological assessment of selected biologically activated sorbents for treating wastewater polluted with petroleum products with special emphasis on polycyclic aromatic hydrocarbons. *Water, Air, & Soil Pollution*, 2008, vol. 195, iss. 1–4, pp. 243–256. <https://doi.org/10.1007/s11270-008-9743-7>
- Bertani G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 1951, vol. 62, no. 3, pp. 293–300. <https://doi.org/10.1128/jb.62.3.293-300.1951>
- Bourceret A., Leyval C., Faur P., Lorgeoux C., Cebren A. High PAH degradation and activity of degrading bacteria during alfalfa growth where a contrasted active community developed in comparison to unplanted soil. *Environmental Science and Pollution Research*, 2018, vol. 25, iss. 29, pp. 29556–29571. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2744-1>
- Brzeszcz J., Kaszycki P. Aerobic bacteria degrading both n-alkanes and aromatic hydrocarbons: An undervalued strategy for metabolic diversity and flexibility. *Biodegradation*, 2018, vol. 29, iss. 4, pp. 359–407. <https://doi.org/10.1007/s10532-018-9837-x>
- Ely C. S., Smets B. F. Bacteria from wheat and cucurbit plant roots metabolize PAHs and aromatic root exudates: Implications for rhizodegradation. *International Journal of Phytoremediation*, 2017, vol. 19, iss. 10, pp. 877–883. <https://doi.org/10.1080/15226514.2017.1303805>
- Cushnie T. P., Lamb A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2005, vol. 26, iss. 5, pp. 343–356. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2005.09.002>
- Danciu C., Pinzaru I. A., Dehelean C. A., Hancianu M., Zupko I., Navolan D., Licker M., Ghiulai R. M., Şoica C. M. Antiproliferative and antimicrobial properties of pure and encapsulated rutin. *Farmacia*, 2018, vol. 66, no. 2, pp. 302–308.
- Golubev S. N., Muratova A. Yu., Panchenko L. V., Shchyogolev S. Yu., Turkovskaya O. V. *Mycolicibacterium* sp. strain PAM1, an alfalfa rhizosphere dweller, catabolizes PAHs and promotes Partner-plant growth. *Microbiological Research*, 2021, vol. 253, iss. 8, article number 126885. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126885>
- Hegde R. S., Fletcher J. S. Influence of plant growth stage and season on the release of root phenolics by mulberry as related to development of phytoremediation technology. *Chemosphere*, 1996, vol. 32, iss. 12, pp. 2471–2479. [https://doi.org/10.1016/0045-6535\(96\)00144-0](https://doi.org/10.1016/0045-6535(96)00144-0)
- Ite A. E., Semple K. T. The Effect of Flavonoids on the microbial mineralisation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *International Journal of Environmental Bioremediation and Biodegradation*, 2015, vol. 3, iss. 3, pp. 66–78. <https://doi.org/10.12691/ijebb-3-3-1>
- Jones D. L., Darrah P. R. Role of root derived organic-acids in the mobilization of nutrients from the rhizosphere. *Plant and Soil*, 1994, vol. 166, iss. 2, pp. 247–257. <https://doi.org/10.1007/BF00008338>
- Jones D. L., Prabowo A. M., Kochian L. V. Kinetics of malate transport and decomposition in acid soils and isolated bacterial populations – the effect of microorganisms on root exudation of malate under al stress. *Plant and Soil*, 1996, vol. 182, iss. 2, pp. 239–247.
- Kim S. J., Kweon O., Cerniglia C. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by mycobacterium strains. In: K. N. Timmis, ed. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Berlin, Heidelberg, Springer, 2010, pp. 1865–1879.
- Kuiper I., Kravchenko L. V., Bloemberg G. V., Lugtenberg B. J. J. *Pseudomonas putida* strain PCL 1444, selected for efficient root colonization and naphthalene degradation, effectively utilizes root exudate components. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2002, vol. 15, no. 7, pp. 734–741. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2002.15.7.734>

- Lu L., Chai Q., He Sh., Yang Ch., Zhang D. Effects and mechanisms of phytoalexins on the removal of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by an endophytic bacterium isolated from ryegrass. *Environmental Pollution*, 2019, vol. 253, pp. 872–881. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.07.097>
- Macias-Benitez S., Garcia-Martinez A. M., Caballero Jimenez P., Gonzalez J. M., Tejada Moral T., Parrado Rubio J. Rhizospheric organic acids as biostimulants: monitoring feedbacks on soil microorganisms and biochemical properties. *Frontiers in Plant Science*, 2020, vol. 11, article number 633. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00633>
- Mejia A. C. G., Pino N. J., Peñuela G. A. Effect of secondary metabolites present in *Brassica nigra* root exudates on anthracene and phenanthrene degradation by rhizosphere microorganism. *Environmental Engineering Science*, 2018, vol. 35, iss. 3, pp. 203–209. <https://doi.org/10.1089/ees.2017.0156>
- Muratova A., Hübner Th., Tisher S., Turkovskaya O., Möder M., Kuschk P. Plant – rhizosphere-microflora association during phytoremediation of PAH-contaminated soil. *International Journal of Phytoremediation*, 2003, vol. 5, iss. 2, pp. 137–151. <https://doi.org/10.1080/713610176>
- Peng X., Xu P. F., Du H., Tang Y., Meng Y., Yuan L., Sheng L. P. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons: A review. *Applied Ecology and Environmental Research*, 2018, vol. 16, no. 5, pp. 6419–6440. https://doi.org/10.15666/aecer/1605_64196440
- Qiu X., Reed B. E., Viadero R. C. Effects of flavonoids on 14C(7,10)-benzo(a)pyrene degradation in root zone soil. *Environmental Engineering Science*, 2004, vol. 21, no. 5, pp. 637–646. <https://doi.org/10.1089/ees.2004.21.637>
- Rym K. H., Eo S. K., Kim Y. S., Lee C. K., Han S. S. Antimicrobial activity and acute toxicity of natural rutin. *Korean Journal Pharmacognosy*, 1996, vol. 27, no. 4, pp. 309–315.
- Schwab A. P., Banks M. K. Biologically mediated dissipation of polyaromatic hydrocarbons in the root zone. In: T. A. Anderson, J. R. Coats, eds. *Bioremediation through Rhizosphere Technology*. Washington, American Chemical Society, 1994, pp. 132–141. <https://doi.org/10.1021/BK-1994-0563.CH012>
- Shahsavari E., Schwarz A., Aburto-Medina A., Ball A. S. Biological degradation of polycyclic aromatic compounds (PAHs) in soil: A current perspective. *Current Pollution Reports*, 2019, vol. 5, iss. 3, pp. 84–92. <https://doi.org/10.1007/s40726-019-00113-8>
- Siciliano S. D., Germida J. J. Mechanisms of phytoremediation: Biochemical and ecological interactions between plants and bacteria. *Environmental Reviews*, 1998, vol. 6, no. 1, pp. 65–79. <https://doi.org/10.1139/a98-005>
- Tuyishime M. A., Harimana Y., Sun J. Biotransformation of rutin to quercetin by human gut bacteria and its effect on rutin bioavailability. *Research Inventy*, 2018, vol. 8, iss. 2, pp. 11–17.
- Vidonish J. E., Zygourakis K., Masiello C. A., Sabadell G., Pedro J. J., Alvarez P. J. J. Thermal treatment of hydrocarbon-impacted soils: A review of technology innovation for sustainable remediation. *Engineering*, 2016, vol. 2, iss. 4, pp. 426–437. <https://doi.org/10.1016/J.ENG.2016.04.005>
- Wang Z., Ding Z., Li Z., Ding Y., Jiang F., Liu J. Antioxidant and antibacterial study of 10 flavonoids revealed rutin as a potential anti-biofilm Agent in *Klebsiella Pneumoniae* strains isolated from hospitalized patients. *Microbial Pathogenesis*, 2021, vol. 159, article number 105121. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.105121>
- Weston L. A., Mathesius U. Flavonoids: Their structure, biosynthesis and role in the rhizosphere, including allelopathy. *Journal of Chemical Ecology*, 2013, vol. 39, iss. 2, pp. 283–297. <https://doi.org/10.1007/s10886-013-0248-5>
- Yoshitomi K. J., Shann J. R. Corn (*Zea mays* L.) root exudates and their impact on 14C-pyrene mineralization. *Soil Biology and Biochemistry*, 2001, vol. 33, iss. 12–13, pp. 1769–1776. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(01\)00102-X](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(01)00102-X)