

Биоремедиационный потенциал сорго веничного

Е. В. Дубровская*, А. Ю. Муратова, Н. Н. Позднякова,
В. С. Гринев, С. Н. Голубев, А. Д. Бондаренкова, О. В. Турковская

*Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН
Россия, 410049 г. Саратов, проспект Энтузиастов, 13.*

*Email: dubrovskaya_e@ibppm.ru

В условиях вегетационных и полевых экспериментов была показана перспективность использования сорго веничного для фиторемедиации почв, загрязненных углеводородами, благодаря наличию у него активной внутри- и экстра-клеточной ферментной системы и способности селективно поддерживать популяцию ризосферных микроорганизмов-деструкторов.

Ключевые слова: сорго веничное, фиторемедиация, дизельное топливо, ПАУ, антрахиноновые красители, пероксидаза, микроорганизмы-деструкторы.

Сорго представляет интерес в качестве растения-фиторемедианта, оно образует обильную биомассу, характеризуется высокой засухоустойчивостью и неприхотливостью. Сообщалось о его успешном использовании для биоремедиации почвы, загрязненной металлами [1], цианидами [2], нефтью [3].

В вегетационных экспериментах оценивалась перспективность использования сорго веничного (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) для очистки почвы, загрязненной дизельным топливом марки ДТ-Л. Дизельное топливо оказывало значительный фитотоксический эффект, проявлявшийся в снижении накопления как надземной, так и подземной биомассы примерно в 10 раз (Таблица 1), снижении всхожести и энергии прорастания семян, однако практически все взошедшие растения выжили в загрязненной почве. Несмотря на значительное снижение ростовых показателей сорго, эффективность фиторемедиации была отчетливой, за 70 суток эксперимента убыль составила более 25%. Эффективность сорго веничного для очистки грунта от ПАУ оценивали в вегетационных экспериментах, загрязняя галечно-песчаный грунт фенантеном (PHE) (100 и 10 мг/кг). Присутствие фенантрена существенно повлияло на всхожесть сорго, она снижалась на 26 и 40% при концентрации ПАУ 10 и 100 мг/кг соответственно. Кроме того, значительно увеличилось время прорастания семян (Таблица 1). Присутствие фенантрена достоверно снижало выживаемость растений сорго, при содержании фенантрена 100 мг/кг к концу эксперимента осталось лишь около 30% от всходов. В присутствии фенантрена существенно снижался прирост биомассы растений, при низком уровне загрязнения примерно вдвое, в сильнозагрязненном грунте масса побегов снижалась в 2.5 раза, а корней была меньше почти в 13 раз.

Таблица 1. Ростовые и деградативные показатели сорго при очистке грунта от дизельного топлива ДТ-Л и фенантрена

Грунт	Энергия прорастания, % от контроля	Всхожесть, % от контроля	Масса корней, % от контроля	Масса побегов, % от контроля	Выживаемость, % от контроля	Убыль, % от контроля
Выщелоченный чернозем ДТ-Л, 10 г/кг	34.4±4.2	79.4±2.1	10.3±2.7	9.0±4.1	97.7±3.8	25.5±6.2
Песчано-галечный грунт, РНЕ 0.01 г/кг	48.5±3.4	76.0±1.6	41.0±9.2	50.0±15.4	85.0±9.0	41.0±17.3
Песчано-галечный грунт, РНЕ 0.1 г/кг	43.4±3.0	60.0±1.6	7.7±2.31	38.0±10.3	30±2.9	92.9±5.9

Несмотря на выраженное угнетение растений, наблюдалась существенная убыль загрязнителя [4]. При исходной концентрации 10 мг/кг уже через месяц его элиминация в ризосферной зоне составила более чем 90%, в последующем процесс замедлялся (Рис. 1).

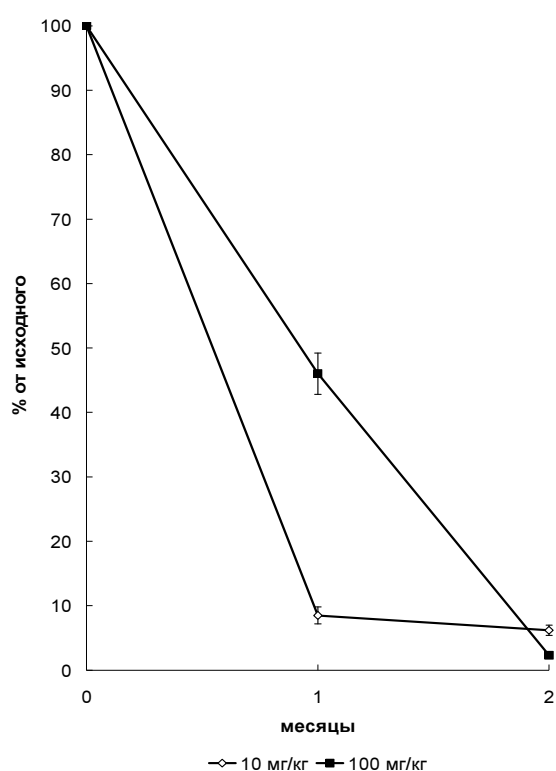


Рис. 1. Остаточное содержание фенантрена в ризосфере сорго при исходном загрязнении 0.01 и 0.1 г/кг [4].

При высоком исходном содержании загрязнителя за первый месяц убыль составляла лишь 54%, в течение второго месяца скорость деградации не снижалась, и к концу экс-

перимента разрушилось почти 98% фенантрена. Использование песчано-галечного грунта и его предварительная подготовка (обработка HCl и высушивание при 170°C), стерилизация семян перед посевом позволили свести к минимуму развитие микроорганизмов – в заключительной стадии эксперимента общая численность гетеротрофов не превышала 10^{-2} КОЕ/г грунта. При такой плотности микробная популяция не способна эффективно разрушать загрязнитель, это дает основание полагать, что основной вклад в элиминацию фенантрена внесли растения.

Известно, что растения способны осуществлять ферментативную деградацию органических токсикантов путем характерных для растительных клеток метаболических превращений. Peroксидазы, фенолоксидазы, цитохром P450-содержащие монооксигеназы являются основными ферментами, которые осуществляют разложение ксенобиотиков в растениях, [5–7]. Обнаружение пероксидазной, тирозиназной и оксидазной активностей в тканях корней и корневых экссудатах сорго позволяет говорить об активной деградации загрязнителя в ризосферной зоне растения [4, 8, 9]. Было установлено, что максимальной активностью из вышеперечисленных ферментов обладали пероксидазы. Существует точка зрения, согласно которой основная часть ксенобиотиков окисляется пероксидазой [10]. Данная гипотеза базируется на таких аргументах, как широкое распространение пероксидазы в компонентах растительной клетки, низкая субстратная специфичность этих ферментов, сродство их с ксенобиотиками разной химической структуры и другие. В растениях пероксидазу можно обнаружить во всех тканях, фермент локализован в клеточной стенке, в вакуолях, тонопласте, пластидах, мембранах эндоплазматического ретикулума и плазмалеммы.

Peroксидазы сорго подразделяют на катионные и анионные формы. Катионные пероксидазы, в целом, более активны и обильны, чем анионные, они представлены во всех сортах и на всех стадиях развития [11]. Электрофорез в неденатурирующих условиях грубых ферментных препаратов из корней позволил нам выявить как минимум 6 форм пероксидаз, три из которых могут быть отнесены к катионным (KPerox), три – к анионным формам (APerox) (Рис. 2).

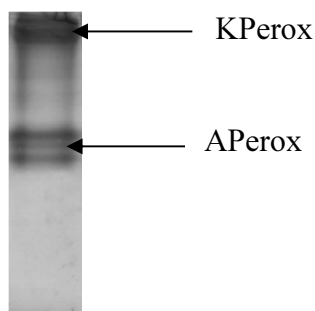


Рис. 2. Электрофорез в неденатурирующих условиях ферментного препарата из корней сорго веничного.

При проверке способности доминантной KPerOx разрушать ПАУ и их производные, установлено, что фермент проявлял активность по отношению к фенантрону (PHE), 9-фенантролу (PH-ol), гидроксинафтойной (HNA), салициловой (SAL) и дифеновой (DPH) кислотам, что выразалось в убыли этих веществ из реакционной смеси (Рис. 3) [12]. Наиболее значительным было окисление фенантрола (100%), при этом в реакционной смеси обнаруживались и продукты реакции – 9,10-фенантренхинон и 2,2'-дифеновая кислота. KPerOx была способна полностью окислять 1-нафтол, предположительно, с образованием олигомеров (ди-, три- и тетрамеров [13].

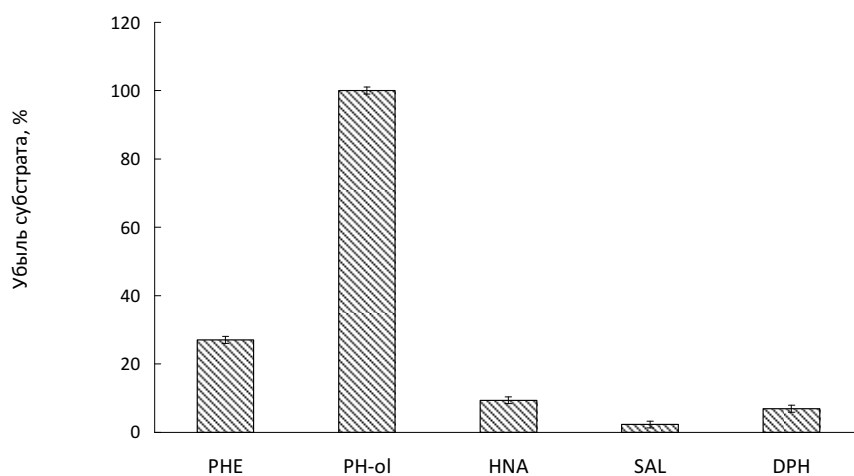


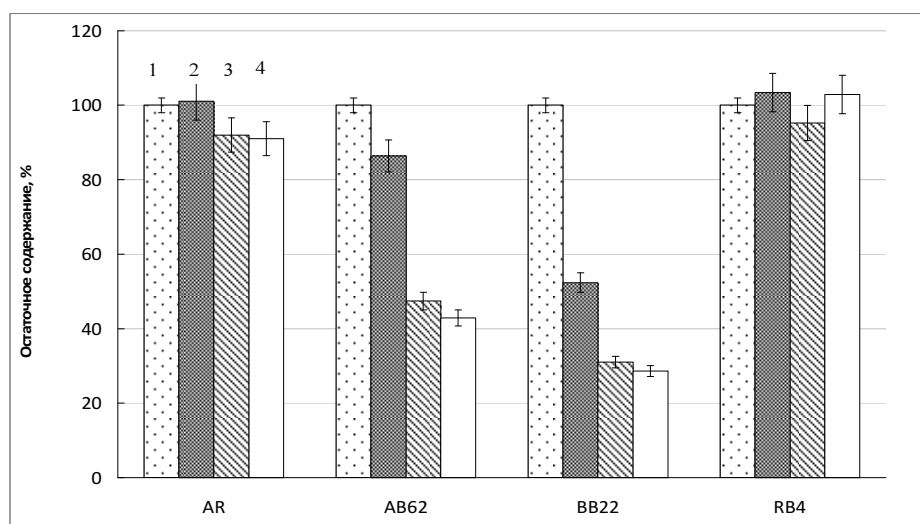
Рис. 3. Окисление ПАУ и их производных KPerOx сорго веничного [12].

Еще одну группу загрязнителей, устойчивых к биологическому окислению, представляют синтетические антрахиноновые красители (ализариновый красный (AR); Acid Blue 62 (AB62); Basic Blue 22 (BB22); Reactive Blue 4 (RB4), сходные по структуре с ПАУ, центральную часть молекулы которых занимают три конденсированных ароматических кольца.

Было установлено (Рис. 4), что AR и RB4 были мало доступны для KPerOx. Их обесцвечивание не превышало 10% за 5 суток инкубации. Два других красителя, AB62 и BB22, в значительной степени подвергались пероксидазному окислению. Обесцвечивание этих красителей достигало 57 и 71% соответственно [12].

Известно, что пероксидазы составляют основную долю ферментов, поступающих в ризосферу с корневыми экссудатами. Их окислительная активность в отношении ПАУ, описанная выше, доказывает участие этих ферментов в элиминации органических загрязнителей в корневой зоне растений. Однако основная роль в этом процессе при-

надлежит ризосферным микроорганизмам. Показано, что растения сорго в условиях загрязнения способны селективно поддерживать популяцию штаммов-деструкторов. Так, при выращивании сорго веничного в грунте, загрязненном фенантроном в концентрации 0.01 и 0.1 г/кг, доля штамма-деструктора широкого спектра углеводов *Ensifer meliloti* P221, которым были инокулированы растения, составляла через месяц 51 и 32% от общей численности культивируемых гетеротрофных микроорганизмов соответственно, против 10% в чистом грунте [14]. Было установлено, что эти партнеры способны образовывать и длительное время поддерживать ассоциацию. Ее эффективность для очистки почв от углеводов была подтверждена в условиях полевого опыта при фиторемедиации почвы, загрязненной дизельным топливом. Растения сорго хорошо развивались на загрязненной почве, образуя большую как подземную, так и надземную биомассу. Доля интродуцированного штамма в ризосфере составляла 8.5% в условиях открытого грунта через 80 суток эксперимента [15]. Убыль загрязнителя составила 88% от исходной концентрации.



1 – 0 ч, 2 – 5 мин, 3 – 1 ч, 4 – 5 суток

Рис. 4. Окисление КРегох антрахиноновых красителей: AR; AB62; BB22; RB4 [12].

Таким образом, сорго веничное обладает собственной ферментной системой, способной окислять широкий круг поллютантов. Оно формирует устойчивые ассоциации с ризосферными микроорганизмами-деструкторами. Это определяет его высокий потенциал использования в технологиях фиторемедиации загрязненных почвенных территорий.

Работа выполнена при поддержке грантом РФФИ № 16-04-00351 – в части, касающейся растительных ферментов; а также в рамках темы госзадания № АААА-А17-117102740093-3 – в части, касающейся фиторемедиации.

Литература

1. Xu Y., Yamaji N., Shen R., Ma J. F. Sorghum Roots are Inefficient in Uptake of EDTA-chelated Lead // *Annals of Botany*. 2007. Vol. 99. P. 869–875.
2. Hong L. Y.; Banks M. K.; Schwab A. P. Removal of cyanide contaminants from rhizosphere soil // *Bioremediation Journal*. 2008. Vol. 12. P. 210–215.
3. Banks M. K., Kulakow P., Schwab A. P., Chen Z., Rathbone K. Degradation of crude oil in the rhizosphere of *Sorghum bicolor* // *Int. J. Phytoremediation*. 2003. Vol. 5(3). P. 225–234.
4. Muratova, A., Pozdnyakova, N., Golubev, S., Wittenmayer, L., Makarov, O., Merbach, W., Turkovskaya O. Oxidoreductase activity of sorghum root exudates in a phenanthrene-contaminated environment // *Chemosphere*. 2009. Vol. 74. P. 1031–1036.
5. Дубровская Е. В., Поликарпова И. О., Муратова А. Ю., Позднякова Н. Н., Чернышова М. П., Турковская О. В. Изменение ростовых и физиолого-биохимических параметров сорго веничного в присутствии фенантрена // *Физиология растений*. 2014. Т. 61. №4, С. 565–573.
6. Schaffner A., Massner B., Langebartels C., Sandermann H. Genes and enzymes for in-planta phytoremediation of air, water and soil // *Acta Biotechnol*. 2002. Vol. 22. P. 141–152.
7. Schroder P. Exploiting plant metabolism for the phytoremediation of organic xenobiotics // *Methods in biotechnology, vol.23: Phytoremediation: methods and reviews* / Ed. N. Willey. – Humana Press, Totowa, NJ. 2008. P. 251–263.
8. Квеситадзе Г. И., Хатисашвили Г. А., Садунишвили Т. А., Евстигнеева З. Г. Метаболизм антропогенных токсикантов в высших растениях. Москва: Наука, 2005. 199 с.
9. Dubrovskaya E. , Pozdnyakova N., Golubev S., Muratova A., Grinev V., Bondarenkova A., Turkovskaya O. Peroxidases from root exudates of *Medicago sativa* and *Sorghum bicolor*: Catalytic properties and involvement in PAH degradation // *Chemosphere*. 2017. Vol. 169. P. 224–232.
10. Kvesitadze E., Sadunishvili T., Kvesitadze G. Mechanisms of organic contaminants uptake and degradation in plants // *World Academy of science, Engineering and Technology*. 2009. Vol. 55. P.458–468.
11. Dicko, M. H., Gruppen, H., Hihorst, R., Voragen, A. G. J., van Berkel, W. J. H. Biochemical characterization of the major sorghum grain peroxidase // *FEBS J*. 2006. Vol. 273. P. 2293–2307.
12. Kulys J., Vidziunaite R., Schneider P. Laccase-catalyzed oxidation of naphthol in the presence of soluble polymers // *Enzyme Microb. Tech*. 2003. Vol. 32. P. 455–463.
13. Дубровская Е. В., Позднякова Н. Н., Гринев В. С., Муратова А. Ю., Голубев С. Н., Бондаренкова А. Д., Турковская О. В. Доминирующая форма катионной пероксидазы из корней сорго веничного // *Физиология растений*. 2016. Т. 63, №. 3. С. 359–371.
14. Муратова А. Ю., Голубев С. Н., Мербах В., Турковская О. В. Биохимические и физиологические особенности взаимодействия *Shinorhizobium meliloti* и *Sorghum bicolor* в присутствии фенантрена // *Микробиология*. 2009. Т. 78, №3. С. 347–354.
15. Муратова А. Ю., Бондаренкова А. Д., Голубев С. Н., Панченко Л. В., Турковская О. В. Способ фиторемедиации грунта, загрязненного углеводородами (варианты). Патент РФ №2403102. 2010. Бюл. №31. 10 с. с приоритетом от 15.05.2009.

Bioremediation potential of *Sorghum bicolor*

E. Dubrovskaya*, A. Muratova, N. Pozdnyakova, V. Grinev,
S. Golubev, A. Bondarenkova, O. Turkovskaya

*Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms,
Russian Academy of Sciences
13 Entuziastov Avenue, 410049 Saratov, Russia.*

**Email: dubrovskaya_e@ibppm.ru*

The promise of use of *Sorghum bicolor* for the phytoremediation of hydrocarbon-contaminated soils was shown in pot and field experiments to be due to the plant's endo- and extracellular enzyme activity and ability to selectively maintain degradative microorganisms in its root zone.

Keywords: *Sorghum bicolor*, phytoremediation, diesel fuel, PAH, anthraquinone dyes, peroxidase, degradative microorganisms.