



БИОМИКА/BIOMICS

<http://biomics.ru>



ФЕРМЕНТЫ ФЕНОЛОКСИДАЗНОГО КОМПЛЕКСА АЗОСПИРИЛЛ ВО ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С РАСТЕНИЕМ-ХОЗЯИНОМ

Купряшина М.А., Пономарева Е.Г., Никитина В.Е.

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН
410049, Саратов, просп. Энтузиастов 13, e-mail: kupryashina_m@mail.ru

Резюме

Для исследования зависимости активности фенолоксидаз от присутствия растения-хозяина, проводили инокуляцию трехсуточных стерильных проростков пшеницы сорта Саратовская 29 бактериями рода *Azospirillum*, с последующим сокультивированием в течение 4 недель. Обнаружено, что при инокуляции бактериями пшеницы происходит увеличение лакказной и Мп-пероксидазной активности в среде выращивания по сравнению с контрольными образцами. Полученные в ходе исследования данные указывают на то, что Мп-пероксидазы и лакказы аккумулируются в зоне бактериальных скоплений, на поверхности корня инокулированного растения, что свидетельствует о возможном участии данных ферментов в адаптации азоспирилл к условиям ризосферы. Вероятно, что продукция внеклеточных фенолоксидаз функционально значима не только для бактерий, но и для растения-хозяина. Лакказы, лигнин- и Мп-пероксидазы за счет окислительных реакций могут опосредовать снижение негативного действия токсических веществ, аккумулирующихся в почве.

Ключевые слова: *Azospirillum*; фенолоксидазы; биodeградация; ремазол ярко-голубой R 19

Цитирование: Купряшина М.А., Пономарева Е.Г., Никитина В.Е. Ферменты фенолоксидазного комплекса азоспирилл во взаимодействии с растением-хозяином. *Биомика*. 2018. Т.10(2). С. 165-168. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-22

PHENOL OXIDASES COMPLEX ENZYMES OF AZOSPIRILLUM IN HOST PLANTS INTERACTIONS

Kupryashina M.A., Ponomareva E.G., Nikitina V.E.

Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences
13 Prospekt Entuziastov, 410049, Saratov, Russia, e-mail: kupryashina_m@mail.ru

Resume

The three-day sterile wheat seedlings of Saratovskaya strain 29 were inoculated with *A. brasilense* Sp245 (endophytic strain) and Sp7 (epiphytic strain) with subsequent co-cultivation for 4 weeks to study the dependence of phenol oxidases activity in the presence of host plant. The inoculation of wheat with bacteria resulted in increase of laccase and Mn-peroxidase activity in the growing medium compared to the control samples. The obtained data indicate that Mn-peroxidases and laccases are accumulated in the bacterial cluster zones on the root surface activity thus indicating the possible role of these enzymes for azospirilles adaptation to rhizosphere conditions. It can be assumed that extracellular phenol oxidase production is functionally significant both for bacteria and host plants. The kinetic properties of laccases, lignin and Mn-peroxidases mediate the elimination of the negative effect of toxic substances accumulated in soil.

Keywords: *Azospirillum*; phenol oxidase; biodegradation; remazol reactive blue R 19

Citation: Kupryashina M.A., Ponomareva E.G., Nikitina V.E. Phenol oxidases complex enzymes of *Azospirillum* in host plants interactions. *Biomics*. 2018. V.10(2). P. 165-168. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-22 [In Russian]

Проблема молекулярных механизмов взаимодействия симбиотических микроорганизмов с растениями в зоне ризосферы, по-прежнему, остается особенно дискуссионной [Fibach-Paldi et al., 2011]. Одними из наиболее исследуемых модельных объектов ассоциативного симбиоза являются бактерии рода *Azospirillum*. Ранее нами была обнаружена способность бактерий рода *Azospirillum* к синтезу фенолокисляющих ферментов [Nikitina et al., 2010, Купряшина и др., 2012 / Kupryashina et al., 2012]. Мы предположили, что продукция фенолоксидаз, благодаря кинетическим свойствам данных ферментов, может быть связана с механизмами адаптации, позволяющими существовать азоспириллам в условиях ризосферы и преодолевать фенольный барьер, возникающий при становлении взаимодействий с растением-хозяином.

Для исследования зависимости активности Mn-пероксидазы, лигнин-пероксидазы и лакказы от присутствия растения хозяина, проводили инокуляцию трехсуточных стерильных проростков пшеницы сорта Саратовская 29 штаммами *A. brasilense* Sp245 и Sp7, с последующим сокультивированием в течение 4 недель на среде для выращивания растений [Шелудько и др., 2010 / Shelud'ko et al., 2010]. Активность ферментов определяли спектрофотометрически: Mn-пероксидазы по скорости окисления 2,6-диметоксифенола при $\lambda=468$ нм [Paszczynski et al., 1988], лигнин-пероксидазы по скорости окисления вератрилового спирта до вератрилового альдегида при $\lambda=310$ нм [Orth et al., 1993], лакказы по скорости окисления синингалдазина при $\lambda=530$ нм [Koroleva et al., 2002].

Было обнаружено, что при сокультивировании бактерий и пшеницы происходит увеличение лакказной и Mn-пероксидазной активности в среде выращивания по сравнению с вариантами, содержащими только бактерии, а также с неинокулированными образцами. Интересным представляется тот факт, что при совместном культивировании бактерий с растением-хозяином активность лигнин-пероксидазы детектировалась в следовых количествах, при этом различий между штаммами не отмечалось.

На следующем этапе работы с применением окрашивания специфическими хромогенными субстратами на фенолоксидазную активность (2,6-диметоксифенола и *o*-дианизида) и метода световой микроскопии были получены микрофотографии скоплений бактериальных клеток на поверхности корня пшеницы. Из рисунка 1 видно, что зоны бактериальных скоплений окрашивались 2,6-диметоксифенолом и *o*-дианизидином, что подтверждает факт накопления фенолокисляющих ферментов. В контрольных образцах, не содержащих бактерий, подобной окраски не наблюдалось. В случае инкубации инокулированных образцов корней с *o*-дианизидином отмечали появление темно-коричневого окрашивания только после внесения в реакционную среду перекиси, что свидетельствовало о проявлении активности пероксидаз фенолоксидазного комплекса. Аналогичное окрашивание отмечали как для эндофитного штамма *A. brasilense* Sp245, так и для *A. brasilense* Sp7, для которого характерна поверхностная колонизация корня.

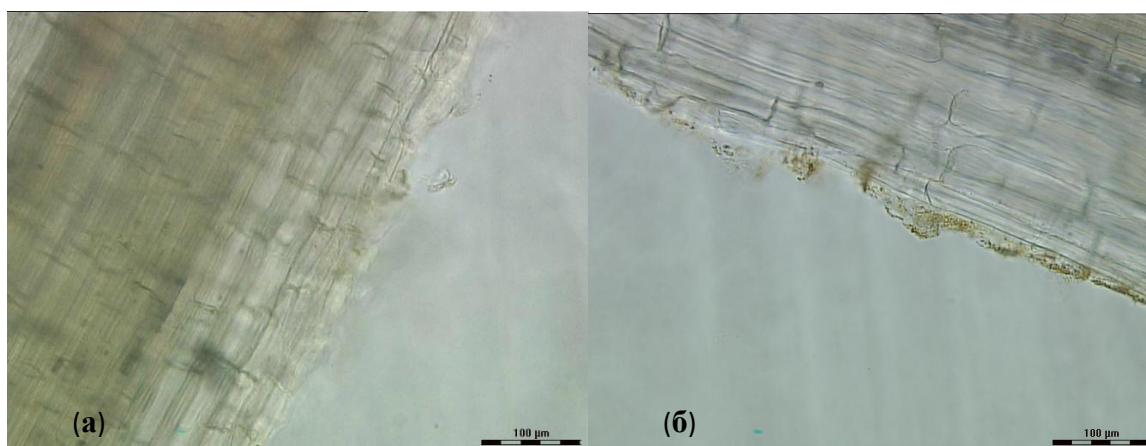


Рис. 1. Световая микроскопия (а) контроль; (б) образец поверхности корня, колонизированного штаммом *A. brasilense* Sp245 (окраска 2,6-диметоксифенол)

Fig. 1. Light microscopy (a) control; (b) sample of root surface colonized by *A. brasilense* Sp245 strain (2,6-dimethoxyphenol staining)

Общеизвестно, что одним из основных способов выживания бактерий во внешней окружающей среде является образование скоплений и биопленок, внутри которых накапливаются биологически активные вещества и ферменты [Burdman et al., 2000]. Полученные данные указывают на то, что Mn-пероксидазы и лакказы аккумулируются в зоне бактериальных скоплений, на

поверхности корня инокулированного растения, что свидетельствует о возможном участии данных ферментов азоспирилл в адаптации бактерии к условиям ризосферы.

Не исключено, что благодаря своей окислительной способности ферменты фенолоксидазного комплекса азоспирилл могут опосредованно влиять и на растение-хозяина,

снижая действие токсических веществ, накапливающихся в почве. Относительно недавно, была показана эффективность фенолоксидаз грибов в биодegradации ремазола ярко-голубого [Sumandono et al., 2015]. Ремазол ярко-голубой R (Remasol Reactive Blue R 19, RRBR) – краситель, активно используемый в текстильной и целлюлозно-бумажной промышленности и являющийся распространенным трудно разлагаемым органоуполнотантом. Попадая с недоочищенными сточными водами в акваторию и в оросительные системы на поля сельскохозяйственного назначения, органоуполнотанты способны негативно влиять на плодородие почвы и урожай [Bhatt et al., 2000].

При культивировании на жидкой питательной среде в присутствии ремазола ярко-голубого мы обнаружили способность бактерий рода

Azospirillum к обесцвечиванию данного красителя. Бактерии выращивали на жидкой малатно-солевой среде (МСС) [Dobereiner et al., 1976]. Далее было проведено исследование фитотоксичности ремазола до и после биодegradации. Исследование токсичности проводилось по отношению к пшенице сорта Саратовская 29. Семена раскладывали в стерильные чашки Петри с двойным слоем увлажненной фильтровальной бумаги из расчета 15-20 семян на чашку, вносили жидкую питательную среду, содержащую 0,05 мМ ремазол ярко-голубой до и после биодegradации бактериями *A. brasilense* и культивировали при температуре 22°C. Для определения степени токсичности внесенного препарата оценивали % прорастания семян, длину корней и побегов через 5 дней инкубации (Таблица 1).

Таблица 1.

Фитотоксичность ремазола ярко-голубого R 19 до и после биодegradации

	% прорастания семян	Вес корней, мг	Длина корней, мм	Вес корней на одну зерновку, мг	Вес проростков, мг	Длина проростков, мм	Вес проростков на одну зерновку, мг
МСС	75±4%	252±38	18±0,7	23±3	829±5	90±3	84±0,7
МСС, ремазол	39±2%	25±3	3,6±0,3	2,7±0,5	335±8	37±2	38±1,4
МСС, ремазол, после биодegradации	68±4%	330±28	21±1,2	25±1,7	1050±7	98±4	83±3

Table 1.

Phytotoxicity of remasol reactive blue R 19 before and after biodegradation

	Seed germination percentage	Root mass, mg	Root length, mm	Root mass for one caryopsis, mg	Seedling mass, mg	Seedling length, mm	Seedling mass for one caryopsis, mg
malate-salt medium (MSM)	75±4%	252±38	18±0,7	23±3	829±5	90±3	84±0,7
MSM, remasol	39±2%	25±3	3,6±0,3	2,7±0,5	335±8	37±2	38±1,4
MSM, remasol, after biodegradation	68±4%	330±28	21±1,2	25±1,7	1050±7	98±4	83±3

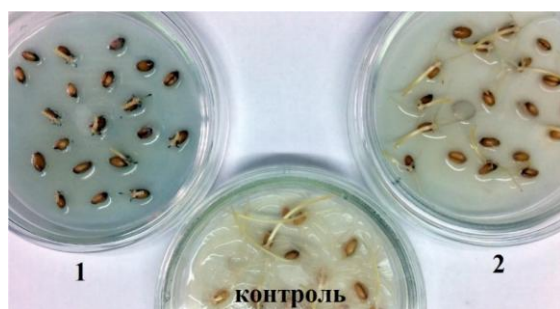


Рис. 2. Токсичность ремазола ярко-голубого по отношению к пшенице до (1) и после биодegradации азоспириллами (2)

Fig. 2. Toxicity of remasol reactive blue R 19 to wheat before (1) and after biodegradation by *Azospirillum* (2)

Установлено, что % прорастания семян, а также вес и длина корней и проростков значительно снижались, при культивировании пшеницы в присутствии ремазола ярко-голубого, как по сравнению контролем, так и с вариантами, инкубируемыми с продуктом разложения ремазола под действием азоспирилл (Таблица 1, Рис. 2). Следовательно, биодegradация красителя микробной культурой, привела к его детоксикации.

Полученные в рамках настоящей работы результаты расширяют представления об адаптивных возможностях азоспирилл и вносят дополнительные коррективы в понимание участия фенолоксидаз во взаимодействии микрочастника с растением-хозяином при становлении растительно-бактериальной ассоциации.

Часть работы, связанная с исследованием деградации и фитотоксичности ремазола ярко-голубого R, выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-316-00008 мол_а.

Литература

1. Купряшина М.А., Селиванов Н.Ю., Никитина В.Е. Выделение и очистка Mn-пероксидазы *Azospirillum brasilense* Sp245. *Прикл. биохим. и микробиол.* 2012. Т. 48. С.23–26.
2. Никитина В.Е., Ветчинкина Е.П., Пономарева Е.Г., Гоголева Ю.В. Фенолоксидазная активность бактерий рода *Azospirillum*. *Микробиология.* 2010. Т. 79. С. 344–351.
3. Шелудько А.В., Широков А.А., Соколова М.К., Соколов О.И., Петрова Л.П., Матора Л.Ю., Кацы Е.И. Колонизация корней пшеницы бактериями *Azospirillum brasilense* с различной подвижностью. *Микробиология.* 2010. Т. 79. С. 696–704.
4. Bhatt M., Patel M., Rawal B., Novotny C., Molitoris H., Sasek V. Biological decolorization of the synthetic dye RBBR in contaminated soil. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2000. V. 16. P. 195–198.
5. Burdman S., Okon Y., Jurkevitch E. Surface characteristics of *Azospirillum brasilense* in relation to cell aggregation and attachment to plant roots. *Critic. Rev. Microbiol.* 2000. V. 26. P. 91–110.
6. Fibach-Paldi S., Burdman S., Okon Y. Key physiological properties contributing to rhizosphere adaptation and plant growth promotion abilities of *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2012. V. 326. P. 99–108.
7. Koroleva O. V., Stepanova E. V., Gavrilova V. P., Ikovleva N. S., Landesman E. O., Iavmetdinov I. S., Iaropolov A. I. Laccase and Mn-peroxidase production by *Coriolus liugutis* strain 075 in a jar fermentor. *J. Biosci. Bioengineer.* 2002. V. 93. P. 449–455.
8. Orth A.B., Royse D.J., Tien M. Ubiquity of lignin-degrading peroxidases among various wood-degrading fungi. *Appl. Envir. Microb.* 1993. V. 59. P. 4017–4023.
9. Paszczynski A., Crawford R., Huynh V.B. Manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*: purification. *Methods Enzymol.* 1988. V. 161. P. 264–270.
10. Sumandono T., Saragiha H., Watanabeb T., Amirta R. Decolorization of remazol brilliant blue R by new isolated white rot fungus collected from tropical rain forest in East Kalimantan and its ligninolytic enzymes activity. *Proced. Environmen. Sci.* 2015. V. 28. P. 45–51.

References

1. Bhatt M., Patel M., Rawal B., Novotny C., Molitoris H., Sasek V. Biological decolorization of the synthetic dye RBBR in contaminated soil. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2000. V. 16. P. 195–198.
2. Burdman S., Okon Y., Jurkevitch E. Surface characteristics of *Azospirillum brasilense* in relation to cell aggregation and attachment to plant roots. *Critic. Rev. Microbiol.* 2000. V. 26. P. 91–110.
3. Fibach-Paldi S., Burdman S., Okon Y. Key physiological properties contributing to rhizosphere adaptation and plant growth promotion abilities of *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2012. V. 326. P. 99–108.
4. Koroleva O. V., Stepanova E. V., Gavrilova V. P., Ikovleva N. S., Landesman E. O., Iavmetdinov I. S., Iaropolov A. I. Laccase and Mn-peroxidase production by *Coriolus liugutis* strain 075 in a jar fermentor. *J. Biosci. Bioengineer.* 2002. V. 93. P. 449–455.
5. Kupryashina M.A., Selivanov N.Yu., Nikitina V.E. Isolation and purification of Mn-peroxidase from *Azospirillum brasilense* Sp245. *Appl. Biochem. Microbiol.* 2012. V. 48. P. 17–20. (In Russian).
6. Nikitina V.E., Vetchinkina E.P., Ponomareva E.G., Gogoleva Yu.V. Phenol oxidase activity in bacteria of the genus *Azospirillum*. *Microbiol.* 2010. V. 79. P. 327–333. (In Russian).
7. Orth A.B., Royse D.J., Tien M. Ubiquity of lignin-degrading peroxidases among various wood-degrading fungi. *Appl. Envir. Microb.* 1993. V. 59. P. 4017–4023.
8. Paszczynski A., Crawford R., Huynh V.B. Manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*: purification. *Methods Enzymol.* 1988. V. 161. P. 264–270.
9. Shelud'ko A.V., Shirokov A.A., Sokolova M.K., Sokolov O.I., Petrova L.P., Matora L.Y., Katsy E.I. Wheat root colonization by *Azospirillum brasilense* strains with different motility. *Microbiol.* 2010. V. 79. P. 688–695. (In Russian).
10. Sumandono T., Saragiha H., Watanabeb T., Amirta R. Decolorization of remazol brilliant blue R by new isolated white rot fungus collected from tropical rain forest in East Kalimantan and its ligninolytic enzymes activity. *Proced. Environmen. Sci.* 2015. V. 28. P. 45–51.