

Министерство образования и науки Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ Н.Г.ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра микробиологии и физиологии растений

**ФЕРМЕНТЫ ФЕНОЛОКСИДАЗНОГО КОМПЛЕКСА В
БИОДЕГРАДАЦИИ СИНТЕТИЧЕСКИХ КРАСИТЕЛЕЙ**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

студентки 4 курса 421 группы
направления 06.03.01 Биология
биологического факультета

Воробьевой Светланы Александровны

Научный руководитель
доцент кафедры микробиологии
и физиологии растений, к.б.н., доцент

_____ А.М. Петерсон

Научный консультант
старший научный сотрудник лаборатории
микробиологии ИБФРМ РАН, к.б.н., с.н.с.

_____ Е.Г. Пономарева

Зав. кафедрой микробиологии
и физиологии растений, д.б.н., профессор

_____ С.А. Степанов

Саратов 2017

Введение

Актуальность темы. В настоящее время синтетические красители широко используются в текстильной и пищевой промышленности в качестве добавок в нефтяные продукты и т. д. Известно, что более 10000 различных красителей используются в промышленности и свыше 7×10^5 тонн ежегодно производится во всем мире [1]. К сожалению, на большинство из них не действуют традиционные способы очистки, и они сохраняются в окружающей среде благодаря высокой устойчивости к воздействию света, температуры, воды, моющих средств, химикатов. Большая часть красителей при деградации способна образовывать продукты, которые являются высокотоксичными и канцерогенными. Красители представляют собой потенциальную опасность для живых организмов, поэтому важно защитить окружающую среду от таких загрязнителей.

В последние годы большое внимание уделено поискам методов деградации синтетических красителей. Физико-химические методы требуют много энергии и использования химических веществ, которые вызывают вторичное загрязнение, вследствие чего требуется дополнительная обработка. Биологический метод ферментативного разложения считается экологически безопасным и простой альтернативой процессам химического разложения [2].

Согласно литературным источникам, фенолоксиляющие ферменты микробного происхождения, такие как лакказа, тирозиназа, марганец-пероксидаза и лигнин-пероксидаза способны к разложению разного рода красителей [3, 4, 5, 6].

Учитывая тот факт, что в лаборатории микробиологии ИБФРМ РАН В.Е. Никитиной с соавторами [7] ранее была обнаружена способность бактерий рода *Azospirillum* продуцировать как внеклеточные, так и внутриклеточные лакказы, марганец-пероксидазы, лигнин-пероксидазы и тирозиназы, которые способны к деградации фенольных соединений, было предпринято данное исследование

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы явилось изучение биодegradации азокрасителей и красителей антрахинонового ряда бактериями рода *Azospirillum*. Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

1. Установить способность штаммов бактерий рода *Azospirillum* к деградации синтетических красителей и оценить влияние на этот процесс концентрации вносимого вещества.
2. Выявить зависимость степени деградации от времени культивирования бактерий в присутствии красителя.
3. Проанализировать зависимость эффективности разрушения синтетических красителей азоспириллами от температуры.

Материалы и методы исследования. Исследование проводилось на базе лаборатории микробиологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук (ИБФРМ РАН).

В качестве объектов исследования были выбраны штаммы бактерий рода *Azospirillum* из коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН: *A. brasilense* Sp245, Sp107, Sp7, SR 80 и *A. lipoferum* Sp59b выделенные из ризосферы злаковых растений, *A. thophilum* Bv-S выделенный из умеренно-термального сероводородного источника. Выбор данных штаммов был обусловлен наличием у них высокого уровня продукции лакказ, лигнин- и марганец-пероксидаз.

В качестве модельного азокрасителя был выбран метиловый оранжевый («РеаХим», Россия), антрахинонового красителя – ремазол ярко-голубой (реактивный 19) («Sigma-Aldrich», США).

Культивирование бактерий проводили в колбах Эрленмейера (250 мл) на жидкой малатно-солевой среде следующего состава (г/л): KH_2PO_4 - 0.1; K_2HPO_4 - 0.4; NaCl - 0.1; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0.002, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0.2; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0.02; яблочная кислота - 5.0; NaOH - 1.7; NH_4Cl - 1.0; CaCl_2 - 0.02; pH - 6.8 [8]. Среду стерилизовали в течение 30 мин при +121°C.

Посевным материалом служила 24-часовая культура, выращенная на среде того же состава.

Эксперименты проводили в 100 мл колбах Эрленмейера, в которых содержалось 50 мл синтетической среды, краситель в конечной концентрации 1 мМ; 0,1 мМ; 0,05 мМ; 0,01 мМ и взвесь бактерий, предварительно культивируемых на той же среде. Контрольные колбы содержали краситель и питательную среду того же состава.

Влияние температуры определяли путем культивирования в температурном диапазоне от +25 до +45°C с шагом в 5°.

Для анализа изменения степени обесцвечивания бактериями красителей пробы культуральной жидкости отбирали через каждые 48 часов.

Эффективность обесцвечивания анализировали путем измерения оптической плотности культуральной жидкости при длине волны 440 нм и 595 нм, для метилового оранжевого и ремазола ярко-голубого, соответственно. Степень разрушения красителя выражали в процентах и рассчитывали по формуле:

$$\%_{\text{обесцвечивания}} = 100 \times \frac{A_{\text{нач}} - A_{\text{кон}}}{A_{\text{нач}}},$$

где $A_{\text{нач}}$ – начальное поглощение, а $A_{\text{кон}}$ – конечное поглощение красителя после культивирования [9].

Все эксперименты проводились в трех повторностях. При оценке полученных результатов пользовались методом расчета стандартного отклонения среднего арифметического с использованием программы Microsoft Office Excel 2010; доверительные интервалы рассчитывали при уровне достоверности $p < 0,05$.

Структура и объём работы. Работа изложена на 51 странице, включает в себя введение, 3 главы, выводы, заключение, список использованных источников. Работа проиллюстрирована 6 рисунками. Список использованных источников включает 106 наименований.

Основное содержание работы

В главе «Обзор литературы» представлен анализ литературных данных о биодegradации синтетических красителей, о деколоризации красителей ферментами грибов и бактерий, о характеристике фенолоксиляющих ферментов и их промышленном использовании, а также представлена общая характеристика бактерий рода *Azospirillum* и их фенолоксидазная активность.

В главе «Результаты исследования» изложены экспериментально полученные данные о биодegradации азокрасителей и красителей антрахинонового ряда бактериями рода *Azospirillum*.

Влияние концентрации вносимого красителя на эффективность дegradации. В эксперимент были взяты исходные концентрации красителей – 1 mM; 0,1 mM; 0,05 mM и 0,01 mM. Отмечено, что все исследуемые нами штаммы оказались способны в той или иной степени дegradировать модельные соединения красителей.

Разрушение метилового оранжевого происходило во всем диапазоне концентраций. Наименьшую способность к обесцвечиванию метилового оранжевого показали штаммы *A. tiophilum* и *A. lipoferum* Sp59b, не сумев преодолеть порог дegradации в 10,5% и 12,5%, соответственно.

Необходимо отметить, что наибольшим потенциалом к обесцвечиванию обладали штаммы *A. brasilense* Sp107 и SR80, у которых процент деколоризации красителей составил более 55%. При внесении метилового оранжевого в среду культивирования в конечной концентрации 1 mM было установлено угнетение роста микроорганизмов, что, вероятнее всего, обусловлено токсическим действием данного соединения. При этом отмечалось снижение степени дegradации красителя. Присутствие азокрасителя в среде выращивания в концентрации от 0,01 до 0,1 mM не оказывало ингибирующего действия на рост всех исследуемых штаммов.

Максимальные показатели разрушения метилового оранжевого детектировалось при концентрации 0,1 mM. Однако концентрация 0,01 mM вызывала уменьшение степени обесцвечивания красителя. По-видимому, это

можно объяснить тем, что данная концентрация является менее токсичной для бактерии и не вызывает активации механизмов резистентности.

Наиболее эффективное обесцвечивание ремазола осуществлялось в концентрациях 0,1 мМ и 0,05 мМ.

Внесение красителя в среду культивирования в конечной концентрации 1 мМ оказывало ингибирующее действие на рост всех исследуемых штаммов, при этом степень деградации красителя составляла 0%. Данный факт может свидетельствовать о токсичном действии ремазола на азоспириллы. Для большинства штаммов деградация красителя в концентрации 0,05 мМ была максимальна.

Наибольшая способность деградации отмечена у штаммов *A. brasilense* Sp7 и *SR80*, превышающая 65%. Минимальное разрушение красителя в данной концентрации наблюдается у *A. lipoferum 59b*, и не превышает 21%. Штаммы *A. brasilense* Sp 107 и Sp 245 обесцвечивают ремазол примерно в равной степени, причем независимо от концентрации. По-видимому, присутствие красителя в среде выращивания в концентрации от 0,1 и 0,05 мМ не оказывало угнетающего воздействия на рост бактерий.

При выборе концентраций красителей мы основывались на экспериментах, описанных в литературе для других микроорганизмов [10, 11, 12]. Установлено, что присутствие высоких концентраций вызывает угнетение роста микроорганизмов, что вероятно связано с токсичностью данных веществ, а вместе с тем и уменьшение процента деградации. Однако, способность некоторых штаммов переносить повышенные концентрации красителей делает их использование перспективным для обработки реальных загрязнений окружающей среды

Влияние времени культивирования бактерий на процесс обесцвечивания. Практически для всех взятых в эксперимент штаммов было характерно увеличение степени обесцвечивания внесенного красителя с течением времени. Данная закономерность прослеживается и в работах других авторов [12, 13, 14]

При деградации метилового оранжевого штаммы *A. tiophilum* и *A. lipoferum* Sp59b даже с увеличением времени культивирования до 8 дней не могли преодолеть порог деградации красителя в 22%, в то время как *A. brasilense* Sp107 и SR 80 обесцвечивали среду более чем на 45% уже на 2 сутки выращивания. При этом процент разрушения метилового оранжевого данными штаммами с течением времени культивирования значительно не изменялся.

Для штаммов *A. brasilense* Sp7 и Sp245 было характерно более выраженное увеличение степени обесцвечивания красителя с течением времени, что позволяло данным штаммам на 8 сутки культивирования по своей эффективности в деколоризации достичь уровня штаммов *A. brasilense* Sp107 и SR80.

При изучении деградирующей способности *Pseudomonas putida*, *Comamonas testosterone*, *P. plecoglossicida*, *P. monteilii*, *Aeromonas hydrophila*, *Lysinibacillus fusiformis* в отношении метилового оранжевого М.Н. Fulekar с соавторами [13] получены аналогичные результаты. В данном исследовании *Pseudomonas putida* на 3-4 день культивирования разрушал краситель на 80%, тогда как *Comamonas testosterone* смог достичь этого результата лишь на 7-8 сутки. Следует отметить, что эффективность деградации *P. plecoglossicida* составила более 30% на 2 сутки, однако, с течением времени этот показатель падал. Данные различия, вероятно, связаны с накоплением в среде культивирования метаболитов, продуктов распада самих красителей, которые пагубно действуют на бактериальные клетки.

При изучении влияния времени культивирования на разрушение ремазола было установлено, что максимум обесцвечивания у большинства штаммов наблюдался на 6 сутки, среди них самые высокие показатели (более 77 %) были отмечены у *A. brasilense* Sp245 и SR80. Интересно, что при деколоризации метилового оранжевого, данные штаммы не смогли достигнуть такого значения даже на 8 сутки выращивания, однако, показали высокие результаты. Минимальную эффективность в разрушении ремазола

показал штамм *A. lipoferum* Sp59b, достигнувший своего максимума в 30% на 4 сутки культивирования. Штаммы *A. brasilense* Sp7 и SR80 уже на 2 сутки перешли порог в 65%, тогда как *A. tiophilum* достиг данного значения лишь на 8-10 сутки выращивания. Стоит отметить, что *A. tiophilum* при деградации метилового оранжевого, напротив, показал минимальный результат, не превысивший 15% на 8 день культивирования.

При сравнении наших результатов с литературными данными оказалось, что эффективность деградации ремазола азоспириллами лишь незначительно отличается от эффективности обесцвечивания красителя грибами. Так, в экспериментах К. Praveen с соавторами [11] грибы *Stereum ostrea* и *Phanerochaete chrysosporium* на 7 день культивирования разрушали краситель на 90% и 70%, соответственно. Однако, в работе В. Khudhair [12] штаммы *Candida* sp S1 и *Rhizoctonia zea* SOL3 деградировали ремазол медленнее. Даже с увеличением времени культивирования до 15 суток эффективность деколоризации не превысила 50%, что связано с токсичностью конденсированной ароматической структуры ремазола, которая вызывает ингибирование метаболической активности бактерий. Это говорит о том, что использование штаммов *Azospirillum* для деградации азокрасителей является достаточно перспективным.

Влияние температуры культивирования на эффективность разрушения красителей. При изучении влияния температуры культивирования на процесс разрушения метилового оранжевого и ремазола азоспириллами, нами обнаружено, что максимальный процент деградации красителей от 40 до 60% отмечался при температуре культивирования +35°C и +40°C (концентрация красителя 0,05 mM и выращивание в течение 2-х суток), с увеличением температуры эффективность деколоризации уменьшалась. Возможно, это связано с тем, что высокая температура вызывает термическую инактивацию ферментов с помощью которых и происходит разрушение красителей, а также данные условия оказывают

негативное действие на сами бактериальные клетки, которые в результате не синтезируют необходимые ферменты.

Штаммы *A. brasilense* Sp107 и SR80, при деградации метилового оранжевого, показали максимальный процент обесцвечивания при +35°C, составивший более 45%. Следует отметить, что эффективность разрушения красителя данными штаммами находилась в большей зависимости от выбранной температуры культивирования в отличие от *A. brasilense* Sp7 и Sp245, у которых процент деградации не превышал 35%. Известно, что энзиматические системы эпифитов более толерантны к изменению температур, однако, в нашем исследовании как представители эпифитов, так и эндофитов по-разному реагировали на изменение температуры.

Эндофитный штамм *A. brasilense* Sp107 по эффективности обесцвечивания показал результат наравне с эпифитным *A. brasilense* SR80. *A. brasilense* Sp7, относящийся к последним, не проявил максимальной активности при деградации метилового оранжевого, но продемонстрировал высокую стабильность в широком диапазоне температур, как и эндофитный штамм *A. brasilense* Sp245. Стоит отметить, что минимальный процент деградации наблюдался у *A. tiophilum* и *A. lipoferum* Sp59b (не более 5% и 10%, соответственно). Показано, что данные эпифитные штаммы оказались не способны разрушать краситель при повышенных температурах (*A. tiophilum* свыше +35°C, *A. lipoferum* Sp59b свыше +40°C).

При изучении влияния температуры культивирования на эффективность деградации ремазола, наибольший процент обесцвечивания наблюдался при +35°C у эпифитных штаммов *A. brasilense* Sp7 и SR80, и составил более 65%. *A. lipoferum* Sp59b и *A. tiophilum* показали минимальный процент деградации не превысивший 20%. Стоит отметить, что штаммы *A. lipoferum* Sp59b и *A. tiophilum* оказались активны во всем диапазоне температур. Установлено, что эндофитные штаммы более термостабильны. Штамм *A. brasilense* Sp245 показал самый высокий результат: в интервале температур +25-35°C процент обесцвечивания составлял более 45%.

Полученные результаты согласуются с данными литературы, где показано, что наиболее эффективная деградация метилового оранжевого и ремазола бактериями рода *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Lysinibacillus*, *Comamonas* отмечается в диапазоне +35-40°C. У грибных культур высокий процент разрушения красителей отмечается при температуре +28-40°C. Это характерно как для высших, так и для низших представителей царства.

Выводы

1. Установлено, что штаммы *A. brasilense* Sp245, Sp107, Sp7, SR 80, *A. lipoferum* Sp59b и *A. tiophilum* Bv-S способны к деградации азокрасителя – метилового оранжевого и красителя антрахинонового ряда – ремазола ярко-голубого. Максимальную эффективность в деколоризации данных красителей показали: *A. brasilense* Sp7, SR80 и Sp107.

2. Концентрации красителей более 0,1 mM вызывали угнетение роста микроорганизмов и снижали эффективность деградации ремазола ярко-голубого до 0%, метилового оранжевого – до 5 – 18%.

3. Выявлена положительная корреляция между временем культивирования азоспирилл и степенью обесцвечивания красителей. Наиболее выраженное увеличение эффективности деградации происходило у штаммов *A. brasilense* Sp7 и Sp245, которые показали максимальный процент разрушения на 6-8 сутки.

4. Показано, что максимальный процент обесцвечивания метилового оранжевого и ремазола ярко-голубого (от 40 до 60%) отмечался при температуре культивирования +35°C и +40°C, при дальнейшем увеличении температуры эффективность деколоризации уменьшалась.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Chequer, F. M. Textile Dyes: Dyeing Process and Environmental Impact / F. M. Chequer, G. A. Oliveira, E. R. Ferraz [et al.] // Technology. 2013. Vol. 6. P. 350-370.
2. Padhi, B. S. Pollution due to synthetic dyes toxicity and carcinogenicity studies and remediation / B.S. Padshi // International journal of environmental sciences. 2012. Vol. 3, № 3. P. 940-955.
3. Enayatzamir, K. Decolouration of azo dyes by Phanerochaete chrysosporium immobilized into alginate beads / K. Enayatzamir, H. Alikhani, B. Yakhchali [et al.] // Environmental Science and Pollution Research. 2010. Vol. 17. P. 145-153.
4. Park, C. Biodegradation and biosorption for decolorization of synthetic dyes by *Funalia trogii* / C. Park, M. Lee, B. Lee [et al.] // Biochemical Engineering Journal. 2006. Vol. 9, № 1. P. 26–32.
5. Copete, L. S. Identification and characterization of laccase-type multicopper oxidases involved in dye-decolorization by the fungus *Leptosphaerulina* sp. / L. S. Copete, X. Chanagá, J. Barriuso [et al.] // BMC Biotechnology. 2015. Vol. 15. P. 74-85.
6. Ng, T. W. Simultaneous chromate reduction and azo dye decolourization by *Brevibacterium casei*: Azo dye as electron donor for chromate reduction / T. W. Ng, Q. Cai, C. Wong [et al.] // Journal of Hazardous Materials. 2010. Vol. 182. P. 792–800.
7. Никитина, В. Е. Фенолоксидазная активность бактерий рода *Azospirillum* / В. Е. Никитина, Е. П. Ветчинкина, Е. Г. Пономарёва и др. // Микробиология. 2010. Т. 79, № 3. С. 344-351.
8. Sadasivan, L. Flocculation in *Azospirillum brasiliense* and *Azospirillum lipoferum*: exopolysaccharides and cyst formation / L. Sadasivan, C. A. Neyra // J. Bacteriol. 1985. Vol. 163, № 2. P. 716–723.

9. Nidadavolu, S. V. Decolorization of triphenyl methane dyes by *Fomitopsis feei* / S. V. Nidadavolu, K. Gudikandula, S. K Pabba [et al.] // *Natural Science*. 2013. Vol. 5, № 6. P. 30–35.
10. Jarosz-Wilkolazka, A. Fungi and their ability to decolourize azo and anthraquinonic dyes / A. Jarosz-Wilkolazka, A. Leonowicz, J. Kochmanska-Rdest [et al.] // *Enz Microbiol Technol*. 2002. Vol. 30. P. 566–572.
11. Praveen, K. Bio-bleaching of Remazol brilliant blue-19 by *Stereum ostrea* / K. Praveen, K. Y. Usha, K. D. Kumar [et al.] // *Biotech*. 2015. Vol. 5, № 6. P. 983–990.
12. Khudhair, A.B. Decolorization of reactive dyes by consortiums of bacteria and fungi / A. B. Khudhair, T. Hadibarata, A. R. M. Yusoff // *Malaysian Journal of Civil Engineering*. 2015. Vol. 27, № 1. P. 185-196.
13. Fulekar, M. H. Decolourization of Dye Compounds by Selected Bacterial Strains isolated from Dyestuff Industrial Area / M. H. Fulekar, S. L. Wadgaonkar, A. Singh // *Advancements in Research and Technology*. 2013. Vol. 2, № 7. P. 182-192.
14. Osma, J. F. Transformation Pathway of Remazol Brilliant Blue R by Immobilised Laccase / J. F. Osma, J. L. Toca-Herrera, S. Rodríguez-Couto // *Bioresource Technology*. 2010. Vol. 101, № 22. P. 8509-8514.