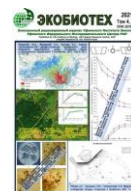




ЭКОБИОТЕХ

ISSN 2618-964X

http://ecobiotech-journal.ru



ВЛИЯНИЕ ЦИКЛОДЕКСТРИНА НА ДЕСТРУКЦИЮ ФЕНОЛА БАКТЕРИЯМИ *PSEUDOMONAS STUTZERI* И *PAENIBACILLUS MACERANS* В ВОДНОЙ СРЕДЕ

Мильман П.Ю.* , Гильванова Е.А.

Уфимский Институт биологии Уфимского федерального
исследовательского центра РАН, Уфа
*E-mail: milman.polina@gmail.com

Циклодекстрины (ЦД) по своей химической природе являются типичными «молекулами-хозяевами», которые могут инкапсулировать широкий спектр молекул, одно или два бензольных кольца, в том числе и фенольное кольцо. ЦД могут влиять на биодоступность загрязнений во время биодegradации, а также токсичность загрязняющего вещества для микроорганизмов за счет их способности образовывать комплексы включения с органическими соединениями. В данной работе использованы штаммы деструкторы фенола *Pseudomonas stutzeri* IB-I6C и *Paenibacillus macerans* IB-I4, обладающие разными ростовыми характеристиками по отношению к тестируемым субстратам: фенол (200 мкг/мл) и ЦД (2 мг/мл). Показано, что при культивировании штаммов на питательной среде, содержащей фенол+циклодекстрин, значительно возрастает деградационный потенциал бактерий по отношению к фенолу. Количество остаточного фенола в присутствии ЦД для культуры *P. stutzeri* IB-I6C к концу культивирования сократилось на 8%, а для *P. macerans* IB-I4 эта величина составила 10%. При наличии ЦД в среде время достижения максимально возможной деструкции фенола сократилось практически вдвое для обоих штаммов-деструкторов. Скорость потребления фенола псевдомонадой IB-I6C в присутствии ЦД увеличилась в 1,36 раз, и в 1,31 раза быстрее происходила утилизация штаммом *P. macerans* IB-I4. Положительный эффект ЦД при деструкции фенола обнаружен даже в том случае, когда ЦД слабо утилизируется микроорганизмом, как это наблюдается у штамма *P. stutzeri* IB-I6C.

Ключевые слова: фенол ♦ биоремедиация ♦ *Pseudomonas stutzeri* ♦ *Paenibacillus macerans* ♦ циклодекстрины

THE EFFECT OF CYCLODEXTRIN ON THE DESTRUCTION OF PHENOL BY BACTERIA *PSEUDOMONAS STUTZERI* AND *PAENIBACILLUS MACERANS* IN THE AQUATIC ENVIRONMENT

Milman P.Yu.* , Gilvanova E.A.

Ufa Institute of Biology of the Ufa Federal Research Centre of
the Russian Academy of Sciences, Ufa
*E-mail: milman.polina@gmail.com

Cyclodextrins (CD) by their chemical nature are typical "host molecules" that can encapsulate a wide range of molecules, one or two benzene rings, including a phenolic ring. CDs can affect the bioavailability of contaminants during biodegradation, as well as the toxicity of the contaminant to microorganisms due to their ability to form inclusion complexes with organic compounds. In this work, the phenol destructor strains *Pseudomonas stutzeri* IB-I6C and *Paenibacillus macerans* IB-I4 were used, which have different growth characteristics in relation to the tested substrates: phenol (200 µg/ml) and CD (2 mg/ml). It was shown that when cultivating strains on a nutrient medium containing phenol+cyclodextrin, the degradation potential of bacteria in relation to phenol significantly increases. The amount of residual phenol in the presence of CD for *P. stutzeri* IB-I6C culture decreased by 8% by the end of cultivation, and for *P. macerans* IB-I4 this value was 10%. In the presence of CD in the medium, the time to achieve the maximum possible destruction of phenol was almost halved for both destructor strains. The rate of phenol consumption by pseudomonas IB-I6C in the presence of CD increased by 1,36 times, and utilization by the *P. macerans* strain IB-I4 was 1,31 times faster. The positive effect of CD in the destruction of phenol was found even in the case when CD is poorly utilized by the microorganism, as is observed in the strain *P. stutzeri* IB-I6C.

Keywords: phenol ♦ bioremediation ♦ *Pseudomonas stutzeri* ♦ *Paenibacillus macerans* ♦ cyclodextrins

Поступила в редакцию: 10.09.2021

ВВЕДЕНИЕ

Фенол и его производные являются одними из наиболее распространенных органических загрязнителей в почвах, воде и сточных водах. Они представляют опасность для окружающей среды и здоровья человека вследствие своих канцерогенных, мутагенных и цитотоксических свойств [Li et al., 2019]. Удаление фенола и его производных обычными физическими и химическими методами было признано небезопасным для окружающей среды процессом [Agora and Bae, 2014]. Микробиологическая детоксикация почвы и сточных вод является эффективной, экономичной и универсальной альтернативой деградации загрязняющих веществ на основе ПАУ [Balachandran et al., 2012; Sherafatmand and Ng, 2015]. Микроорганизмы-деструкторы могут быть устойчивыми к токсичным соединениям только в том случае, если их концентрация не превышает критического уровня, в течение которого токсичные вещества превращаются в нетоксичные вещества в результате метаболических процессов. Соответствующие процедуры адаптации могут повысить допустимую концентрацию токсичных веществ. Но если этот критический уровень концентрации будет превышен даже на короткое время, эти микроорганизмы погибнут. При очистке сточных вод в подобной ситуации детоксицирующая способность живого активного ила необратимо нарушается, и регенерация таких биологических систем представляет восстановительный процесс, требующий некоторое время. Таким образом, сохранение детоксицирующей способности живого ила в промышленных стоках или активного консорциума деструкторов в почве является одной из основных целей защиты окружающей среды.

Основным препятствием для эффективной биодеградации фенола является его низкая биологическая доступность и токсичность для микроорганизмов [Wammer and Peters, 2005]. Для повышения биодоступности фенола перспективным представляется использование циклодекстринов (ЦД), которые способствуют увеличению солубилизации и десорбции загрязняющих веществ [Kong et al., 2018].

Циклодекстрины – природные циклические олигосахариды, молекулы которых, в данном случае первых трех наиболее изученных представителей этого гомологического ряда, построены из шести, семи или восьми d-глюкопиранозных звеньев, связанных между собой альфа-1,4-d-гликозидной связью и, соответственно, имеют названия альфа-, бета- и гамма-ЦД. ЦД имеют кольцевую структуру тороидной формы, которая обеспечивает полую гидрофобную внутреннюю полость, способную образовывать комплексы включения с широким спектром гидрофобных соединений, таких как ароматические соединения, углеводороды, лекарства и т.д. [Valle, 2004]. Если молекула гостя полностью растворена в системе, добавление ЦД приводит к тому, что только часть растворенных молекул гостя остается «свободной», другая образует комплекс и, следовательно, меняет важное свойство, например, его токсичность (рисунок 1).

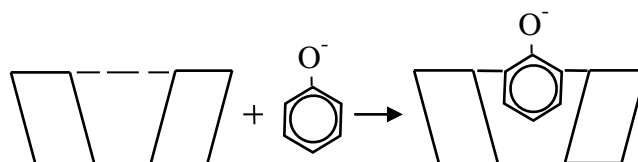


Рис.1. Образование комплекса бета-ЦД и фенола

Фенол, представляя собой гидрофобное соединение, адсорбируется на глиняном и гумусном слоях почвы, и вследствие этого он очень медленно переносится к жидким фазам, где может метаболизироваться микроорганизмами. ЦД улучшают и облегчают десорбцию

загрязняющих веществ за счет увеличения как массопереноса в водную фазу, так и растворимости органических загрязнителей [Mayer et al., 2005]. Учитывая тот факт, что ЦД могут легко образовывать комплексы включения с ароматическими соединениями, в том числе с фенолом, эти комплексы, будучи гидрофильными соединениями, имеют более низкое сродство к липопротеиновым клеточным мембранам, и, следовательно, менее токсичны для микробных клеток. Целью данного исследования является оценить влияние ЦД на процесс биодеструкции фенола бактериальными штаммами в водной среде.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы и условия культивирования. Объектами исследования выбраны штаммы *Pseudomonas stutzeri* IB-I6C и *Paenibacillus macerans* IB-I4, из коллекции микроорганизмов Уфимского Института биологии УФИЦ РАН. Для них проведена таксономическая идентификация методом анализа гена 16S рРНК, прочитанные последовательности депонированы в Генбанке (NCBI) под номерами MW586119 и AM406669 соответственно.

Рост на средах, содержащих бета-ЦД. Оценку роста культур на бета-ЦД проводили на минимальной солевой среде М9 (г/л): Na_2HPO_4 – 6,0; KH_2PO_4 – 3,0; NaCl – 0,5; NH_4Cl – 1,0, содержащей в качестве единственного источника углерода бета-ЦД в конечной концентрации 2 г/л.

Рост на среде с фенолом. Оценку роста культур на феноле в качестве единственного источника углерода проводили на минимальной солевой среде М9 (г/л): Na_2HPO_4 – 6,0; KH_2PO_4 – 3,0; NaCl – 0,5; NH_4Cl – 1,0, содержащей в качестве единственного источника углерода фенол в конечной концентрации 200 мг/л.

Посевной материал засеивали в количестве 0,01% от конечного объема солевой среды. Культивирование проводили в колбах Эрленмейера объемом 250 мл, содержащих 60 мл среды, на шейкере-инкубаторе Innova 40R («New Brunswick Scientific», USA) при 250 об/мин в течение 10 суток при температуре 34⁰С и рН 7,5. Культивирование каждого варианта питательной среды в колбах было выполнено в трехкратной повторности.

Определение бактериального роста. Бактериальный рост оценивали по оптической плотности культуральной жидкости при 600 нм (OD_{600}), измеренной на спектрофотометре СФ-56 («ЛОМО-спектр», Россия) с системой интерфейса на базе персонального компьютера при ширине щели монохроматора 1 нм каждые 24 ч на протяжении 2-7 дней и учитывая значения оптической плотности соответствующего контроля питательной среды.

Определение концентрации фенола. Для этого из проб культуральной среды удаляли клетки микроорганизмов центрифугированием при 5 тыс. об/мин в течение 10 минут. К 5 мл исследуемой пробы последовательно добавляли следующие растворы: 0,03 мл 2%-ного раствора 4-аминоантипирина; 0,1 мл 2н раствора аммиака; 0,1 мл 2%-ного раствора калия железосинеродистого. Смесь перемешивали после добавления каждого компонента реакции, и через 10 минут измеряли коэффициент пропускания на приборе СФ-56 («ЛОМО», Россия) при длине волны 540 нм. Повторность единичных измерений пятикратная, с последующим усреднением результата. Концентрацию фенола определяли по градуировочному графику, построенному в стандартных условиях определения.

Статистическую обработку данных, а также вычисления, связанные с определением скорости деструкции фенола, проводили с использованием пакета прикладных программ «Microsoft Excel 2007». В качестве критерия оценки достоверности наблюдаемых изменений использовали t-критерий Стьюдента при уровне значимости 0.95.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В рамках данной работы в предварительных опытах из нескольких бактериальных культур были выбраны две, продемонстрировавшие разные ростовые характеристики на вариантах минеральной агаризованной среды М9, содержащей в качестве единственного источника углерода фенол (200 мкг/мл) или ЦД (5 мг/мл). Также выбранные штаммы осуществляли рост на среде с нафталином в концентрации 100 мкг/мл (данные не представлены). Представитель *P. macerans*, штамм ИВ-И4 хорошо развивался на среде с ЦД, и слабее на среде с фенолом. Для грамотрицательного штамма *P. stutzeri* ИВ-И6с, являющегося своеобразным отрицательным контролем, наблюдали обратную реакцию: рост на среде с ЦД был существенно хуже, чем на феноле. Такая субстратная избирательность ожидаема, поскольку катаболизм фенола и ЦД у различных групп микроорганизмов протекает по различным метаболическим путям [Nesvera et al., 2015]. Хотя фенол является токсичным соединением, но некоторые микроорганизмы метаболизируют его в качестве источника углерода и энергии. Бактерии, разлагающие фенол, могут использовать его при низкой концентрации, однако по мере увеличения содержания субстрата биотоксичность также возрастает, таким образом, способность к росту и деградации будет постепенно подавляться. Поэтому была изучена динамика роста культур на средах с фенолом и ЦД, и их смеси, чтобы выяснить, используют ли исследуемые микроорганизмы эти соединения в качестве субстрата (рис. 2).

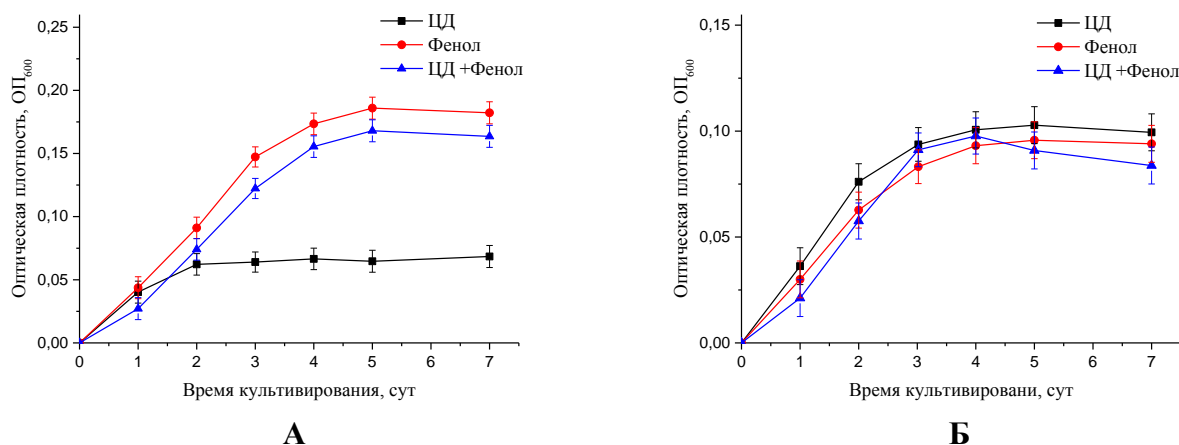


Рис. 2. Оптическая плотность ОП₆₀₀ в культуральной жидкости штаммов *P. stutzeri* ИВ-И6С (А) и *P. macerans* ИВ-И4 (Б) при культивировании на различных средах в течении 7 суток.

P. macerans ИВ-И4 относится к микроорганизмам, способным к синтезу циклодекстринглюканотрансферазы (ЦГТазы), фермента, катализирующего реакции межмолекулярного трансгликозилирования, в своей сумме приводящие к деполимеризации крахмала и образованию ЦД. Для таких культур свойственно расти на средах, содержащих ЦД и способных его использовать в качестве единственного источника углерода [Усанов и др., 1990]. Это происходит благодаря способности к синтезу цикломальтодекстриназ (ЦДаз), гидролизующих ЦД путем расщепления альфа-1,4-d-глюкопираноной связи [Oh, 2003]. Как видно из графика на рис. 2Б, прирост биомассы в вариантах среды ЦД или фенол находится примерно на одном уровне, тогда как рост на среде ЦД+фенол несколько ниже во второй фазе роста.

Для штамма *P. stutzeri* ИВ-И6С, не обладающего ЦГТазной активностью, рост на среде с ЦД практически отсутствовал (рис. 2А). Однако в варианте ЦД+фенол многократно

выросла ОП₆₀₀ плотность клеток, и ряд ростовой активности выглядит следующим образом: ЦД < фенол+бета-ЦД < фенол.

На рисунке 3 показана динамика деградации фенола в отсутствии и присутствии бета-ЦД при культивировании двух исследуемых штаммов микроорганизмов. Оба штамма были достаточно эффективными, но уровень деградативной активности и скорости утилизации фенола заметно отличались между собой.

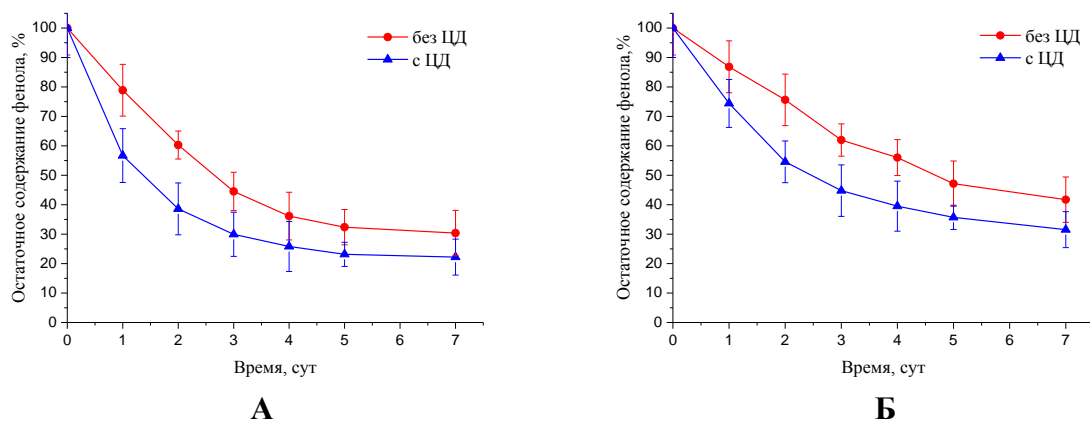


Рис. 3. Влияние бета-ЦД на биодegradацию фенола культурами *P. stutzeri* IB-I6C (А) и *P. macerans* IB-I4 (Б).

Для штамма IB-I6C по истечению 3 суток эксперимента в присутствии ЦД количество остаточного фенола составляет 44%, по сравнению с 30% варианта опыта, в котором ЦД не добавляется. Соответственно время достижения максимально возможной деструкции фенола сокращается практически вдвое.

Остаточное количество фенола в среде для штамма IB-I4 к концу эксперимента составляло около 31%. Учитывая, что без внесения ЦД данный показатель равен 41%, то очевидно, что бета-ЦД способствовал как увеличению биодоступности, так и степени деструкции фенола.

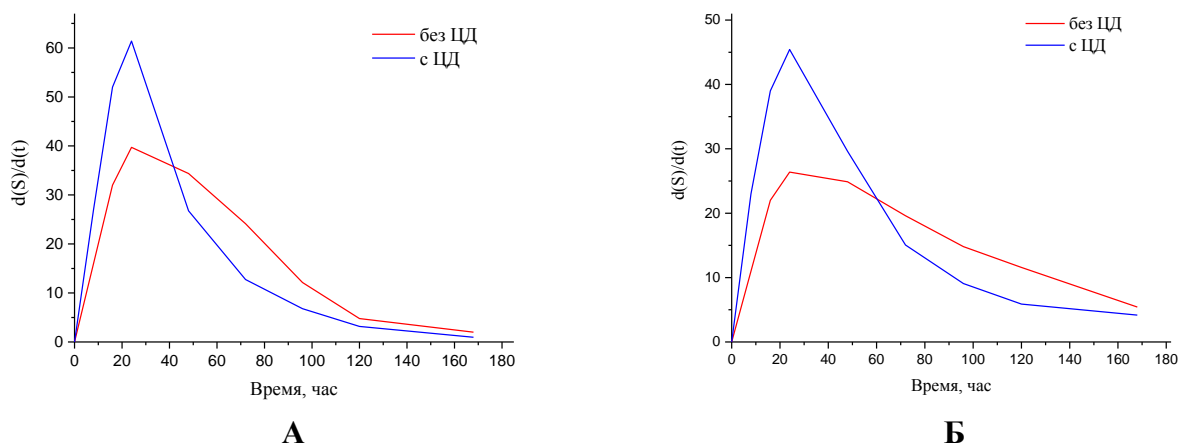


Рис. 4. Скорость деструкции фенола культурами *P. stutzeri* IB-I6C (А) и *P. macerans* IB-I4 (Б).

Определение скорости деструкции фенола основано на определении количества редуцируемого фенола в заданном промежутке времени. Математически она представляет собой первую производную функции количества утилизированного фенола во времени. Первая производная функции деструкции фенола культурами *P. stutzeri* IB-I6C и *P. macerans* IB-I4 во времени, рассчитанная с помощью программы Microcal Origin 2017 SR2, показана на рисунке 4. Экстремальное значение функции скорости деструкции фенола позволяет

рассчитать максимальную величину удельной скорости потребления фенола в расчете на единицу объема культуральной жидкости и сравнить эти величины между штаммами. Максимальная скорость потребления фенола культурой *P. stutzeri* IB-I6С достигала 0,06 г/л фенола/час, тогда как для *P. macerans* IB-I4 эта величина составляет 0,045 г/л фенола/час.

ОБСУЖДЕНИЕ

Скорость деградации фенола выше в присутствии бета-ЦД, главным образом на ранних стадиях. Эти данные свидетельствуют о том, что эффект ЦД максимален вскоре после его добавления. Одним из объяснений может быть то, что образующиеся метаболиты нелегко разлагаются или токсичны.

В случае амилолитических штаммов ожидается, что циклодекстриновые комплексы, как правило, устойчивы к ферментативному гидролизу, поскольку они создают стерические препятствия, так что субстрат не помещается в активный сайт фермента [Chandrasekaran et al., 2010]. Комплексообразование ЦД с фенолом приводит как к растворению, так и к комплексообразованию фаз в среде, и если степень биodeградации увеличивается, то это можно объяснить присутствием ЦД (рис. 3).

Графические зависимости изменения скоростей потребления фенола на разных стадиях роста исследуемых микроорганизмов позволяют определять оптимальный возраст рабочей культуры, когда достигается максимальная скорость и соответственно эффективность, для проектирования, к примеру, непрерывных процессов очистки воды и т.п. Полученные данные по сравнению максимальных скоростей потребления фенола, показали, что, присутствие ЦД оказывает положительный эффект даже в том случае, когда культура слабо или вообще не утилизирует ЦД. В обоих случаях, вероятно, происходит снижение токсичной нагрузки в среде в результате образования комплекса фенола с ЦД, и в дальнейшем образованные комплексы используются как субстратные депо по мере необходимости. Добавление ЦД в водную среду, содержащую фенол, способствует образованию части растворенных молекул гостя с ЦД комплекса, снимая тем самым излишнюю токсическую нагрузку для бактерий, и предоставляя им время для адаптации и трансформации поллютанта.

ЦД улучшают растворимость фенола за счет образования комплексов включения, тем самым, снимая его гидрофобность, снижая токсичность и повышая физическую растворимость в воде, увеличивая его доступность для микроорганизмов. Таким образом, увеличение биodeградации обусловлено увеличением доступности субстратов циклодекстринового комплекса для бактерий, что приводит к более высокой степени биodeградации и сокращению времени биодеструкции.

При проведении исследований использовали оборудование ЦКП "Агидель" УФИЦ РАН. Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России № 075-00326-19-00 по теме № АААА-А18-118022190098-9 «Экологические и генетико-физиологические особенности взаимодействия видов в природных и искусственных сообществах микроорганизмов».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Усанов Н.Г., Гильванова Е.А., Елизарьев П.А. и др. Усовершенствованный метод фотометрического определения активности циклодекстринглюканотрансферазы // Прикладная биохимия и микробиология. 2007. Т. 43 (1). С. 118-124.
2. Усанов Н.Г., Логинов О.Н., Мелентьев А.И. Синтез ЦГТ-аз, микроорганизмами, утилизирующими циклодекстрины в качестве единственного источника углерода // Доклады АН СССР. 1990. Т. 310. № 6. С. 1489-1492.
3. Arora P.K., Bae H. Bacterial degradation of chlorophenols and their derivatives // Microbial Cell Factories. 2014. V.13(1). P. 31. DOI: [10.1186/1475-2859-13-31](https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-31)
4. Balachandran C., Duraipandiyam V., Balakrishna K., Ignacimuthu S. Petroleum and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) degradation and naphthalene metabolism in *Streptomyces* sp. (ERI-CPDA-1) isolated from oil contaminated soil // Bioresource Technology. 2012. V. 112. P. 83. DOI: [10.1016/j.biortech.2012.02.059](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.059)
5. Chandrasekaran S., Ganguly A., Mutnuri S., Goa K.K.B. Biodegradation of hydrocarbons in the presence of cyclodextrins // World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2010. V. 26(2). P. 227-232. DOI: [10.1007/s11274-009-0164-6](https://doi.org/10.1007/s11274-009-0164-6)
6. Kong F.-X., Sun G.-D., Liu Z.-P. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil mesocosms by microbial/plant bioaugmentation: Performance and mechanism // Chemosphere. 2018. V. 198. P. 83-91. DOI: [10.1016/j.chemosphere.2018.01.097](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.01.097)
7. Li J., Yuan G.-L., Li P., Sun Y., et al. The emerging source of polycyclic aromatic hydrocarbons from mining in the Tibetan Plateau: distributions and contributions in background soils // Science of The Total Environment. 2017. V. 584. P. 64-71. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2017.01.146](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.01.146)
8. Li H., Meng F., Duan W., et al. Biodegradation of phenol in saline or hypersaline environments by bacteria: A review // Ecotoxicology and Environmental Safety. 2019. V. 184. P. 1-12. DOI: [10.1016/j.ecoenv.2019.109658](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109658)
9. Mayer P., Karlson U., Christensen A.R., Johnsen A.R., et al. Quantifying the effect of medium composition on the diffusive mass transfer of hydrophobic organic chemicals through unstirred boundary layers // Environmental Science and Technology. 2005. V. 39. P. 6123-6129. DOI: [10.1021/es050556s](https://doi.org/10.1021/es050556s)
10. Nesvera J., Ruck L. Patek M. Catabolism of Phenol and Its Derivatives in Bacteria: Genes, Their Regulation, and Use in the Biodegradation of Toxic Pollutants // Advances in Applied Microbiology. V. 93. P. 1-54. DOI: [10.1016/bs.aambs.2015.06.002](https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2015.06.002)
11. Oh B.-H. The same group of enzymes with different names: Cyclomaltodextrinases, neopullulanases, and maltogenic amylases // Biologia. 2003. V. 58(3). P. 299-305.
12. Sherafatmand M., Ng H.Y. Using sediment microbial fuel cells (SMFCs) for bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) // Bioresource Technology. 2015. V. 195. P. 122-130. DOI: [10.1016/j.biortech.2015.06.002](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.06.002)
13. Valle M.D. Cyclodextrin and their uses: a review // Process Biochemistry. 2004. V. 39. P. 1033-1046. DOI: [10.1016/S0032-9592\(03\)00258-9](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00258-9)
14. Wammer K.H., Peters C.A. Polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation rates: A structure-based study // Environmental Science and Technology. 2005. V. 39. P. 2571-2578. DOI: [10.1021/ES048939Y](https://doi.org/10.1021/ES048939Y)