

ДЕГРАДАЦИЯ азокрасителей и ароматических аминов метаногенными микробными СООБЩЕСТВАМИ ИЗ ИЛОВ ОЧИСТНЫХ СООРУЖЕНИЙ

Из метаногенных илов очистных сооружений выделены микробные консорциумы, с высокой скоростью разлагающие азокрасители и ароматические амины. Описаны процессы деколоризации и приведены схемы деструкции трёх азокрасителей. Показано, что сульфаниловая кислота и 1,4-фенилендиамин в условиях метаногенеза устойчивы к деструкции и накапливаются в среде. Выявлены отличия морфологических признаков образцов исходных илов и адаптированных к ароматическим субстратам микробных сообществ. Описан процесс биodeградации аминокрасителей.



Введение

Азокрасители присутствуют в сточных водах многих производств (текстильных, типографских, пищевых), продуктами их деструкции являются ароматические амины, которые содержатся также в стоках химической и фармацевтической промышленности [1]. Для удаления азокрасителей из окружающей среды используются физико-химические (адсорбция, осаждение, химическое окисление и восстановление, фото- и электрохимическое разложение) и биологические методы. Однако в связи с такими ограничениями в использовании физико-химических методов, как высокое энергопотребление, образование токсичных интермедиатов и высокая стоимость технологий, в последнее время большое внимание уделяют методам с использованием микроорганизмов, способных к деградации азокрасителей [1].

Как правило, для очистки сточных вод используют биореакторы различных технологических типов с естественно сложивши-

Ю.В. Линькова*,
научный сотрудник
кафедры
микробиологии
биологического
факультета,
МГУ
им. М.В. Ломоносова

И.А. Куликова,
выпускница кафедры
микробиологии
биологического
факультета,
МГУ
им. М.В. Ломоносова

мися микробными консорциумами. В состав таких консорциумов входят гидролитические, ацидогенные и метаногенные микроорганизмы [2]. Благодаря комбинации катаболических возможностей в анаэробных условиях может происходить полное разрушение сложного вещества до самых простых (полная минерализация), что недоступно чистым культурам микроорганизмов из-за термодинамических ограничений. Метаногенные микробные консорциумы способны к расщеплению различных ароматических соединений с образованием биогаза. Они не нуждаются в экзогенных акцепторах электронов, поскольку CO_2 образуется при брожениях, входящих в одну из стадий биodeградации ароматики [3].

Целью данной работы было изучение процессов расщепления азокрасителей и продуктов их деструкции – ароматических аминов илами различных очистных сооружений.

* Адрес для корреспонденции: linkovay@gmail.com

Материалы и методы исследования

Источники биологического материала и условия культивирования. В работе использовали неадаптированные анаэробные илы двух видов: флокулярный активный ил очистных сооружений Курьяновской станции аэрации, обрабатывающей бытовые сточные воды (ил КСА), и гранулированный метаногенный ил из анаэробного EGSB-реактора (реактора с расширенным и взвешенным слоем гранул), очищающего стоки пивоваренного завода «Эфес Пилснер» (ил EP). Инкубацию илов осуществляли в минеральной среде [4] при температуре 30 °С и начальном pH 7,0 в темноте в статичных условиях.

Основные реактивы. В качестве субстратов применяли пищевые азокрасители Ponceau S и Tartrazine (Acrus, США) и кислотный азокраситель Methyl Red (MR), широко использующийся в текстильной промышленности (Acrus, США), 2-, 3- и 4-аминобензойные кислоты (2-, 3- и 4-АБК), сульфаниловую кислоту, 1,4-фенилендиамин и *N,N*-диметил-*n*-фенилендиамин (ДМФ) (Aldrich, США).

Аналитические методы. Концентрацию ароматических соединений в культуральной жидкости определяли при соответствующих длинах волн на спектрофотометре «Shimadzu UV-1202» (Япония) (см. *Результаты и обсуждение*). Отобранные пробы центрифугировали при 10000 об/мин в течение 5 мин, затем 100 мкл пробы разбавляли в 2 мл фосфатного буферного раствора (0,1 М, pH 7,0) и измеряли в кварцевой кювете длиной 1 см. Анализ содержания газов проводили на газовом хроматографе ЛХМ 8 МД, модель 3 с катарометром (Россия), газ-носитель – аргон, скорость газа-носителя – 20 мл/мин, при температуре 50 °С. Колонки длиной 2 м заполнены порпаком QS. Объем пробы газа составлял 0,2 мл. Концентрацию аммония определяли по методу Несслера [5].

Результаты и их обсуждение

Деструкция азокрасителей MR, Ponceau S, Tartrazine илами очистных сооружений. Первый этап разрушения азокрасителей в анаэробных условиях заключается в восстановительном разрыве азосвязи, сопровождающемся обесцвечиванием и образованием ароматических аминов [1, 6]. Ил КСА обесцвечивал все три азокрасителя практически без лаг-периода, но с разной скоростью. MR полностью обесцветился через 3, Ponceau S – через 10, а Tartrazine –

И.Б. Котова,
кандидат биологических наук, доцент
кафедры микробиологии биологического факультета,
МГУ
им. М.В. Ломоносова

А.И. Нетрусов,
доктор биологических наук, профессор,
заведующий кафедрой микробиологии биологического факультета,
МГУ
им. М.В. Ломоносова

через 12 сут. Спектрофотометрический анализ культуральной жидкости показал, что деколоризация MR микробным консорциумом КСА сопровождалась исчезновением пика максимума поглощения этого азокрасителя (431нм) и появлением новых пиков, соответствующих максимумам поглощения интермедиатов: ДМФ (242 нм и 297 нм) и 2-АБК (310 нм). После окончания обесцвечивания MR (уравнение 1) началось выделение метана (рис. 1) как за счет деметилирования ДМФ до 1,4-фенилендиамина (уравнение 2), так и за счёт последующей полной минерализации 2-АБК (уравнение 3). 1,4-фенилендиамин был устойчив к дальнейшему разложению и накапливался в культуральной жидкости.

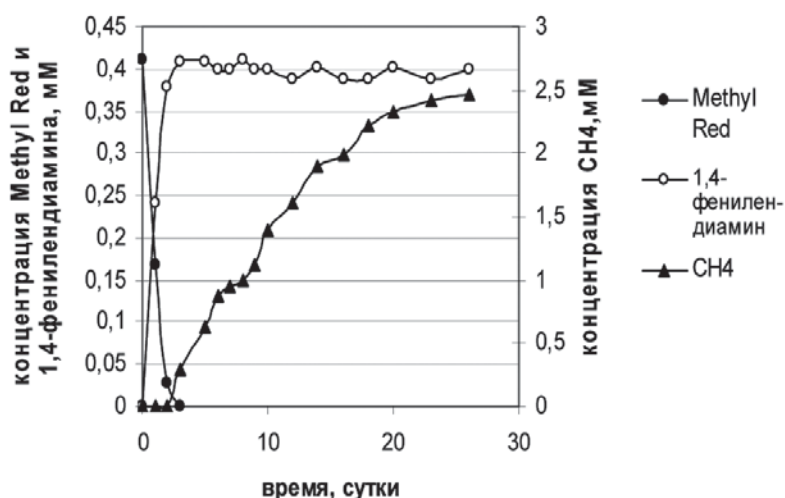
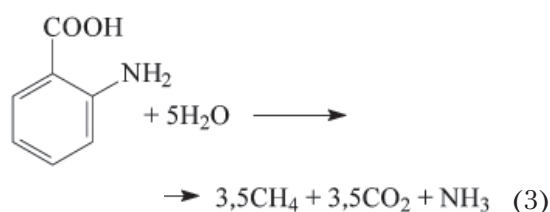
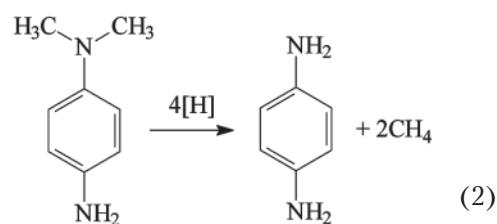
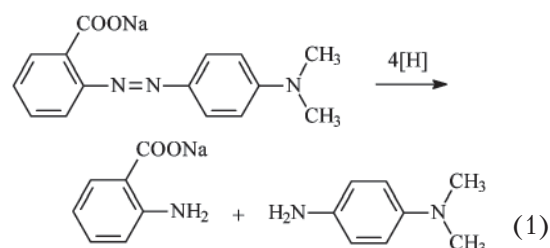


Рис. 1. Разложение азокрасителя MR под действием анаэробного метаногенного консорциума КСА.



Рис. 2. Предполагаемая схема распада Ponceau S.

Количество образовавшегося метана после завершения биodeградации ароматических аминов было в 5,45 раз больше исходного количества MR. Это соответствовало теоретически рассчитанному соотношению (5,5 раз) по уравнениям деметилирования ДМФ до 1,4-фенилендиамина (уравнение 2) и минерализации 2-АБК (уравнение 3).

Под действием ила КСА в варианте, расщепляющем Ponceau S, на 3 сут. цвет культуральной жидкости с красного изменился на оранжевый. При этом регистрировали исчезновение основных пиков максимумов поглощения Ponceau S (352 нм и 520 нм), а также образование в качестве интермедиата сульфаниловой кислоты (250 нм). Концентрация сульфаниловой кислоты в культуральной жидкости со временем повышалась, что свидетельствовало о ее накоплении. Устойчивость этого соединения подтверждается и литературными данными [7]. Одновременно с исчезновением пика 384 нм культуральная жидкость становилась бесцветной. После этого (на 10 сут.) начиналось активное образование биогаза путем разложения не иден-

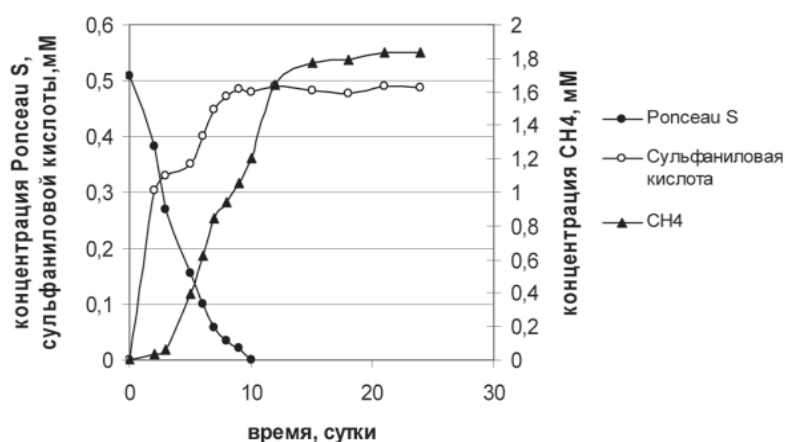


Рис. 3. Разложение азокрасителя Ponceau S под действием анаэробного метаногенного консорциума КСА.

тифицированных нами продуктов конверсии Ponceau S (рис. 2, 3).

Из-за существенного расхождения теоретически рассчитанных (8 ммоль) и экспериментально определённых (3,8 ммоль) количеств образовавшегося метана следует, что минерализация этих неидентифицированных интермедиатов не является полной.





Рис. 4. Предполагаемая схема распада. Tartrazine.

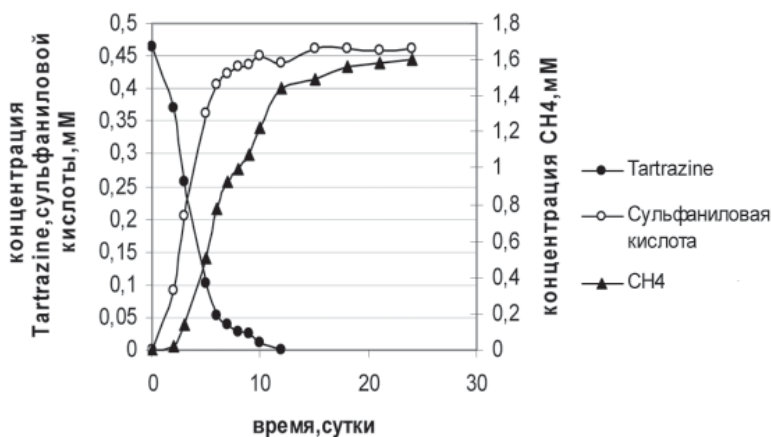


Рис. 5. Разложение азокрасителя Tartrazine под действием анаэробного метаногенного консорциума КСА.

Микробный консорциум КСА полностью обесцвечивал краситель Tartrazine на 12 сут., при этом спектрофотометрическое сканирование культуральной жидкости показывало образование сульфаниловой кислоты, которая, как и в случае Ponseau S, накапливалась в культуральной жидкости (рис. 4). Разложение другого, не идентифицированного нами, интермедиата приводило к образованию метана илом КСА (рис. 5).

Неполная минерализация интермедиатов в данном случае, очевидно, также приводила к тому, что полученное экспериментальным путём значение количества метана (3,5 ммоль) не соответствовало теоретически рассчитанному (5 ммоль).

Таким образом, микробное сообщество КСА обесцвечивало азокрасители и образовывало метан со скоростью, уменьшающейся в ряду: MR (на 3 сут.) > Ponseau S (на 10 сут.) > Tartrazine (на 12 сут.).

Обесцвечивание MR илом EP наблюдали на 3 сут., при этом в культуральной жидкости регистрировали появление ДМФ и 2-АБК (рис. 6).

Оба вещества накапливались и не разлагались в культуральной жидкости в течение 40

сут. В то же время, по имеющимся литературным [6-8] и нашим данным (см. выше) в других условиях возможно последующее деметилирование ДМФ до 1,4-фенилендиамина [6, 7] и минерализация 2-АБК [8].

Полная деколоризация Ponseau S сообществом EP происходила только на 27 сут. Спектрофотометрический анализ показал присутствие в культуральной жидкости тех же интермедиатов деструкции (рис. 7), что и в случае расщепления данного красителя илом КСА, однако выделения метана, отличного от фоновых значений, не наблюдали.

Tartrazine сообществом EP не обесцвечивался. Таким образом, в случае ила EP ни одно из веществ не подвергалось полной минерализации, что подтверждается равенством концентраций метана и углекислого газа в опытных и контрольных вариантах. Данный ил, как и ил КСА, обесцвечивал MR быстрее, чем Ponseau S.

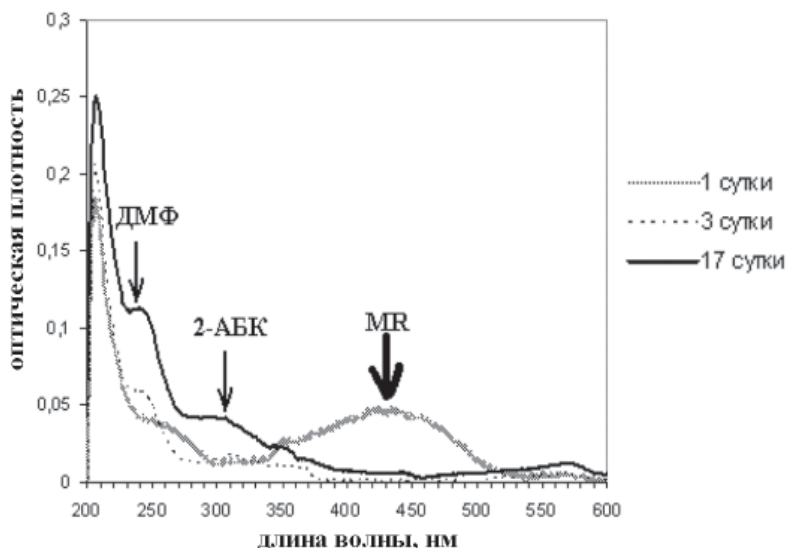


Рис. 6. Динамика изменения спектральных характеристик культуральной жидкости сообщества из ила EP (жирной стрелкой обозначен максимум поглощения азокрасителя, тонкими – продуктов его распада).

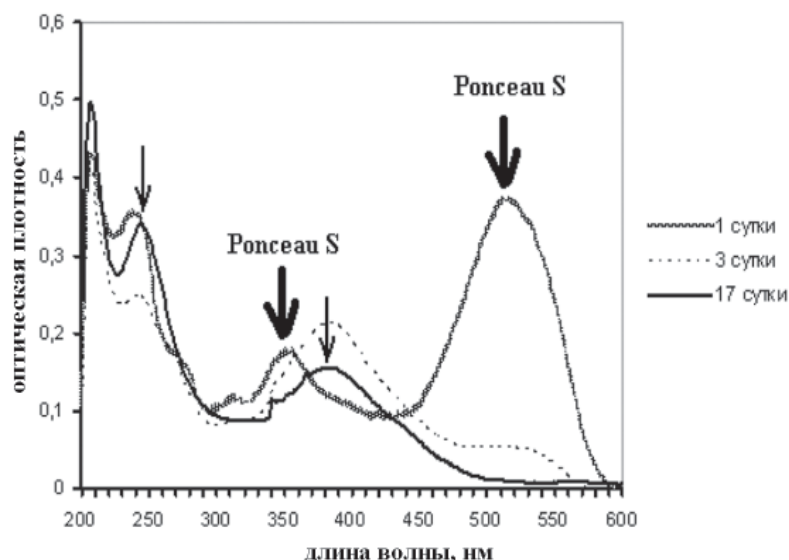


Рис. 7. Динамика изменения спектральных характеристик культуральной жидкости сообщества из ила ЕР (жирными стрелками обозначены максимумы поглощения азокрасителя, тонкими — продуктов распада).

Метан является конечным продуктом биодеградации азокрасителей в микробных консорциумах из ила КСА. Для определения влияния активности последней стадии в цепи реакций полной минерализации азокрасителей (метаногенеза) на скорость первого этапа (восстановительное расщепление азосвязи) для азокрасителей Ponceau S и Tartrazine был проведен эксперимент с внесением в сообщество КСА ингибитора метаногенной активности бромэтансульфоновой кислоты (БЭСК) в концентрации $1 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$. БЭСК добавляли в варианты с азокрасителем в момент внесения инокулята (10 % от объема среды) или сразу после исчезновения окраски культуральной жидкости. Внесение БЭСК в момент посева несколько замедлило полное обесцвечивание Ponceau S (с 10 до 12 сут.) и Tartrazine (с 12 до 24 сут.) по сравнению с вариантами без БЭСК. Независимо от времени внесения БЭСК динамика изменения спектральных характеристик культуральной жидкости была одинаковой. Таким образом, внесение ингибитора метаногенеза приводило к снижению скорости восстановления азосвязи в этих пищевых азокрасителях. В то же время ранее полученные данные для технического азокрасителя MR [7] свидетельствуют о том, что при полном подавлении метанообразования азокраситель подвергался полному обесцвечиванию со скоростью, сравнимой со скоростью процесса в микробном сообществе, обладающем метаногенной активностью. Одной из причин этого может быть более сложная химическая структура пищевых азокрасителей Ponceau S и Tartrazine по сравнению с MR.

В процессе биоконверсии азокрасителей оба консорциума претерпевали определённые морфологические изменения. Так, в сообществе КСА, обесцвечивающем Ponceau S, снижалось общее количество микроорганизмов и начинали преобладать цилиндрические клетки, собранные в цепочки (рис. 8). При инкубации консорциума с двумя другими красителями наряду с уменьшением общего количества клеток наблюдали преобладание цилиндрических и кокковых форм. При инкубации ила ЕР со всеми красителями начинали доминировать кокковые формы и уменьшалось общее число микроорганизмов. При этом на 52 сут. в консорциуме с MR прекращалось обесцвечивание новых порций азокрасителя, что могло быть связано с токсичностью накапливающихся в культуральной жидкости аминокислотных соединений.

Таким образом, в сообществах в течение первых нескольких суток контакта с азокрасителями снижалось общее число клеток и происходила смена доминирующих групп микроорганизмов, что свидетельствует о токсическом и селективном эффекте таких субстратов.

Деструкция ароматических аминов — продукты расщепления азокрасителей илами очистных сооружений. Ароматические амины-ксенобиотики, использованные нами в качестве субстратов, содержатся в сточных водах предприятий химической и фармацевтической промышленности [8]. Они являются продуктами восстановления азокрасителей в анаэробных условиях, например, 2-АБК образуется при восстановлении азокрасителей Methyl Red [6] и Siriuslichtbraun [9]. В природе 2-АБК принимает участие во вторичном метаболизме растений, являясь предшественником синтеза алкалоидов. Нами была изучена биодеградация илами КСА и ЕР одного из интермедиатов деструк-

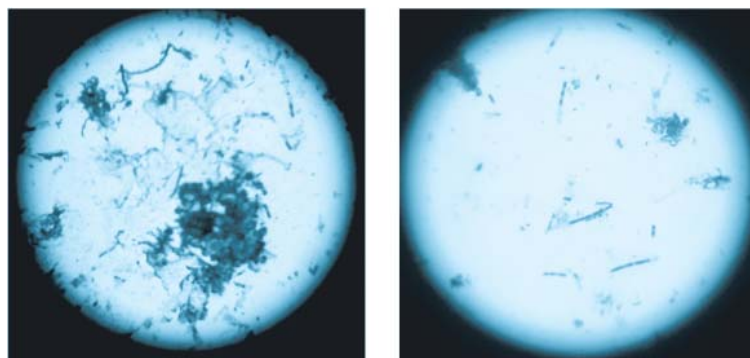


Рис. 8. Микроскопическая картина исходного неадаптированного ила КСА (слева) и активного микробного сообщества КСА, обесцвечивающего Ponceau S (справа) (увеличение $\times 1000$).

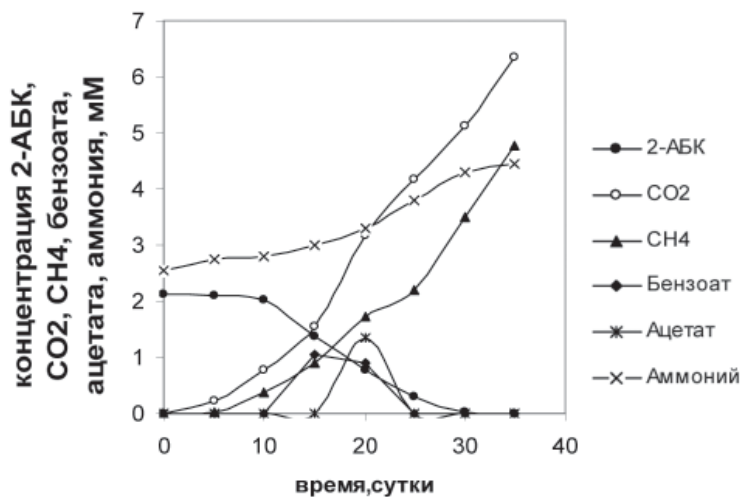


Рис. 9. Деструкция 2-АБК илом КСА.

ции азокрасителя MR 2-АБК, а также ее изомеров (3- и 4-АБК) для выяснения влияния заместителей на процесс деструкции.

Оба ила были способны к биоконверсии 2-АБК, если она использовалась в качестве исходного субстрата и единственного источника углерода и энергии в среде.

Расщепление 2-АБК илом КСА началось после лаг-периода (10 сут.) (рис. 9). В течение последующих нескольких суток регистрировали промежуточные ароматические продукты—бензоат (225 нм) и бензиловый спирт (280 нм). В середине цикла деструкции (т.е. периода времени между внесением субстрата и его полным потреблением) в качестве интермедиатов фиксировали ацетат и следы этанола, а как конечные продукты – CO₂ и CH₄. Последующие циклы деструкции 2-АБК илом КСА протекали без лаг-периода со средней скоростью 0,04-0,06 мМ/сут.

Лаг-период при первом потреблении илом КСА 4-АБК составил 14 сут., а впоследствии метаногенная деградация протекала со скоростью 0,02-0,03 мМ/сут. Потребления 3-АБК илом КСА обнаружено не было.

Образование биогаза (CH₄ и CO₂) свидетельствует о том, что использованные в работе концентрации 2-АБК (2-4 мМ) не оказывали токсического действия на метаногенные организмы, присутствующие в культуре КСА. Полученные нами результаты согласуются с литературными данными, согласно которым изомеры аминокислоты до концентрации 3-7 г/л (20-50 мМ) не ингибируют ацетокластический метаногенез [10].

В исходном иле КСА было 7 морфотипов клеток, число которых на препаратах составляло 2 и более процентов, из них 4 – палочковидных и 3 – кокковидных. Доминировали мелкие светлоокрашенные кокки (34-36 %) и прямые палочки (33-35 %). Через 160 сут.

инкубации консорциума КСА, разлагающего 2-АБК, микроскопический анализ выявил отсутствие крупных диплококков и тетрад кокков, что было связано с токсичностью 2-АБК в использованных концентрациях для данных членов микробного сообщества.

Конверсия 2-АБК илом ЕР началась также после лаг-периода (14 сут.) и завершилась за 38 дней; последующие циклы протекали уже без адаптационного периода. Культура расщепляла 2-АБК со средней скоростью 0,06-0,08 мМ/сут. Последовательность возникновения интермедиатов и их качественный состав были идентичны таковым для ила КСА. 4-АБК данный ил начал разлагать после 18 сут. культивирования со средней скоростью 0,03-0,04 мМ/сут. Деструкции 3-АБК илом ЕР не наблюдали.

Анализ морфологических особенностей консорциума ЕР, расщепляющего 2-АБК, показал снижение количества морфотипов клеток по сравнению с исходным неадаптированным илом с 14 до 5. В консорциуме наблюдали кокки в цепочках и отдельно, короткие толстые палочки, мелкие прямые палочки, фрагментированные палочки с прямыми концами средней длины и длинные тонкие изогнутые палочки либо нити. Появление последнего морфотипа всегда было связано с активным образованием биогаза в конце цикла деструкции.

Таким образом, оба использованных в работе ила из очистных сооружений оказались способны к метаногенному разложению 2-АБК и 4-АБК. 3-АБК этими илами не использовалась.

Сравнение свойств микробных консорциумов из разных илов. Выделенные нами анаэробные консорциумы различались источником получения биологического материала. Так, консорциум ЕР изначально представлял собой неадаптированный ил очистных сооружений пивоваренного завода, стоки которого содержат смесь легкоусваиваемых органических веществ. Культура КСА была получена из неадаптированного активного ила очистных сооружений Курьяновской станции аэрации, способного функционировать как в аэробных, так и в анаэробных условиях. Вещества, входящие в состав бытовых сточных вод, довольно разнообразны по своей химической природе, вследствие чего в составе ила можно было ожидать присутствия микроорганизмов самых разных функциональных групп.

Отсутствие лаг-периода в случае обесцвечивания азокрасителей свидетельствует о неспецифичности этого процесса [1,6,11]. Разные по происхождению сообщества обла-

дали разной активностью по отношению к одному азокрасителю. Наиболее активными являлись микробные сообщества из ила КСА, они оказались способны к метаногенной конверсии всех трёх азокрасителей (MR, Ponceau S, Tartrazine). Сообщества из ила ЕР обесцвечивали только MR и Ponceau S и не проявляли активности в отношении азокрасителя Tartrazine. Микробные консорциумы, выделенные из одного источника, разрушали разные азокрасители с разной скоростью. У консорциумов разного происхождения несколько различались длительность лаг-периода и средняя скорость деструкции при использовании АБК как исходных субстратов. Протяженный лаг-период свидетельствовал об адаптации сообщества к использованию субстрата путем изменения его трофических связей, активизации ферментных систем и оптимизации пространственного расположения клеток [8]. Дальнейшее использование субстрата анаэробными сообществами обычно протекало без лаг-периода. По отношению к 2-АБК обе культуры демонстрировали примерно одинаковую активность и стабильность процесса деструкции. 2-АБК оказалась самым биodeградебельным субстратом для сообществ из разных илов, тогда как 4-АБК использовалась ими менее активно, а 3-АБК не потреблялась совсем.

Ключевые слова:
азокрасители,
ароматические
амины,
биodeградация,
метаногенные илы

Как ароматические амины, так и азокрасители проявляли токсический и селективный эффект по отношению к микробным консорциумам, приводя к снижению количества морфотипов и общего числа клеток в них.

Заключение

Азокрасители и ароматические амины широко используются в различных отраслях промышленности и содержатся в сточных водах соответствующих производств. Ксенобиотики ароматической природы, в силу термодинамической стабильности бензольного кольца, являются устойчивыми к химическому разложению, что приводит к их накоплению и загрязнению биосферы. Применение микроорганизмов, обладающих огромным разнообразием ферментных систем, позволит решить проблему деградации таких соединений.

Изученные нами микробные консорциумы, выделенные из илов различных очистных сооружений, оказались способны к обесцвечиванию азокрасителей и последующей деструкции ряда ароматических аминов с образованием биогаза. Показано, что для обоих сообществ наиболее биodeградебельными субстратами оказались Methyl Red



и 2-АБК. В свою очередь, вещества-ксенобиотики показали влияние на микробные сообщества. В присутствии азокрасителей и ароматических аминов морфологическая структура анаэробных микробных консорциумов подвергалась изменениям: в них снижалось биоразнообразие и сменялись доминирующие виды. Наиболее активными в отношении азокрасителей и ароматических аминов оказались микробные сообщества, выделенные из ила КСА.

Литература

1. Stolz A. Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2001. V. 56. № 1-2. P. 69-80.
2. Satoh H. Layered structure of bacterial and archaeal communities and their in situ activities in anaerobic granules / Satoh H., Miura Y., Tsushima I., Okabe S. // *Appl. Env. Microbiol.* 2007. V. 73. – № 22. P. 7300-7307.
3. Заварзин Г.А. Лекции по природоведческой микробиологии. М.: Наука, 2003. 348 с.
4. Razo-Flores E. Biodegradation of selected azo dyes under methanogenic conditions / Razo-Flores E., Luijten M., Donlon B.A., Lettinga G., Field J. // *Water Sci. Technol.* 1997. V. 36. № 7. P. 65-72.
5. Лурье Ю.Ю. Аналитическая химия промышленных сточных вод. М.: Химия, 1984. 448 с.
6. Емашова Н.А. Особенности разложения азокрасителей анаэробными микробными сообществами / Н.А. Емашова, И.Б. Котова, И.А. Нетрусов, С.В. Калужный // *Прикл. Биохим. Микробиол.* 2009. Т. 45. № 2. С. 195-201.
7. Tan N.C.G. Biodegradation of azo dyes in cocultures of anaerobic granular sludge with aerobic aromatic amine degrading enrichment cultures / Tan N.C.G., Prenafeta-Boldu F.X., Opsteeg J.L., Lettinga G., Field J.A. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1999. V. 51. № 6. P. 865-871.
8. Kotova I.B. Anaerobic microbial communities degrading aminoaromatic acids / Kotova I.B., Savel'eva O.V., D'yakonova A.T., Sklyar V.I., Kalyuzhnyi S. V., Stams A., Netrusov A.I. // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2005. V.41. № 4. P. 372-376.
9. Kalyuzhnyi S. Biomineralization of azo dyes and their breakdown products in anaerobic-aerobic hybrid and UASB reactors / Kalyuzhnyi S., Sklyar V. // *Water Sci. Technol.* 2000. V. 41. № 12. P. 23-30.
10. Kalyuzhnyi S. Methanogenic biodegradation of aromatic amines / Kalyuzhnyi S., Sklyar V., Mosolova T., Kucherenko I., Russkova J., Degtyaryova N. // *Water Sci. Technol.* 2000. V. 42. № 5-6. P. 63-370.
11. Ramalho P.A. Characterization of azo reduction activity in novel ascomycete yeast strain / Ramalho P.A., Cardoso M.H., Cavaco-Paulo A., Ramalho T. // *Appl. Env. Microbiol.* 2004. V. 70. № 4. P. 2279-2288.



Yu.V. Lin'kova, I.A. Kulikova, I.B. Kotova, A.I. Netrusov

AZO DYES AND AROMATIC AMINES DEGRADATION BY METHANOGENIC MICROBAL ASSEMBLAGES ISOLATED FROM SLUDGE TREATMENT FACILITIES

From methanogenic sludges of treatment facilities microbial consortiums with high decomposition rate of azo dyes and aromatic amines have been isolated. Decolorizing process and destruction schemes of three azo dyes have been presented. Sulfanilic acid and 1,4-

phenylenediamine provided methanogenesis were shown to be resistant to destruction and to accumulate in the environment. The difference between morphological characters of original sludges and sludges adapted to aromatic substances of microbial community

have been revealed. The process of aromatic amines biodegradation has been described.

Key words: azo dyes, aromatic amines, biodegradation, methanogenic sludges