



Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2024. Т. 24, вып. 1. С. 58–66

Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology, 2024, vol. 24, iss. 1, pp. 58–66

<https://ichbe.sgu.ru>

<https://doi.org/10.18500/1816-9775-2024-24-1-58-66>, EDN: DNSCSQ

Научная статья

УДК 577.151



Влияние ингибиторов фенолоксидаз на эффективность деколоризации малахитового зеленого бактериями рода *Azospirillum*

М. А. Купряшина^{1,2} ✉, Е. Г. Пономарева¹, А. С. Абдрахманова^{1,3}

¹Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов, ФИЦ «Саратовский научный центр РАН» (ИБФРМ РАН), Россия, 410049, г. Саратов, пр. Энтузиастов, д. 13

²Саратовский государственный медицинский университет имени В. И. Разумовского, Россия, 410012, г. Саратов, ул. Б. Казачья, д. 112

³Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, Россия, 410012, г. Саратов, ул. Астраханская, д. 83

Купряшина Мария Александровна, кандидат биологических наук, ¹заведующий лабораторией микробиологии, ²ассистент кафедры микробиологии, kupryashina_m@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2136-5362>

Пономарева Елена Геннадьевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории микробиологии, ponomareva_e@ibppm.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3701-9090>

Абдрахманова Алена Сергеевна, ¹инженер лаборатории микробиологии, ³магистрант кафедры микробиологии, alena.chernova2018@yandex.ru, <https://orcid.org/0009-0005-2624-9415>

Аннотация. Активное использование синтетических красителей неотрывно связано с увеличивающимися темпами индустриализации. Однако из-за недостаточной результативности работы очистных сооружений до 40% красителей попадают в сточные воды в неизменном виде, загрязняя тем самым окружающую среду. Красители трифенилметанового ряда, в частности малахитовый зеленый, являются токсичными, аллергенными и канцерогенными. Способность к деколоризации и деградации синтетических красителей показана для некоторых бактерий и грибов, являющихся продуцентами фенолокисляющих ферментов, в том числе и для бактерий рода *Azospirillum*. Многие факторы способны индуцировать и ингибировать эффективность биodeградации, в частности ферментативные системы, вовлеченные в процессы обесцвечивания. Представлены результаты исследования влияния типичных деактивирующих агентов фенолоксидаз, таких как H₂O₂, ЭДТА, ДДС-На, β-меркаптоэтанол, дитиотреитол, твин и азид натрия на активность фенолоксидаз азоспирилл и способность к деколоризации малахитового зеленого. Обнаружено, что твин и азид натрия не оказывают ингибирующего воздействия на ферменты азоспирилл и проявляют стабилизирующее действие на весь комплекс в целом. Ингибирующий эффект от 60 до 100% отмечен для лакказной и Mn-пероксидазной активности под действием β-меркаптоэтанол, дитиотреитола и ЭДТА, что прямо пропорционально отражается на степени деколоризации малахитового зеленого. При сравнении полученных сведений с данными литературы для ферментов фенолоксидазного комплекса азоспирилл выявлены не характерные для классических фенолокисляющих ферментов свойства.

Ключевые слова: *Azospirillum*, фенолоксидазы, малахитовый зеленый, деколоризация

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 23-24-00570).

Для цитирования: Купряшина М. А., Пономарева Е. Г., Абдрахманова А. С. Влияние ингибиторов фенолоксидаз на эффективность деколоризации малахитового зеленого бактериями рода *Azospirillum* // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2024. Т. 24, вып. 1. С. 58–66. <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2024-24-1-58-66>, EDN: DNSCSQ

Статья опубликована на условиях лицензии Creative Commons Attribution 4.0 International (CC-BY 4.0)

Article

The effects of phenoloxidase inhibitors on the efficacy of malachite green decolorization by *Azospirillum* bacteria

М. А. Kupryashina^{1,2} ✉, Е. Г. Ponomareva¹, А. S. Abdrakhmanova^{1,3}

¹Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Saratov Scientific Centre of the Russian Academy of Sciences (IBPPM RAS) 13 Entuziastov Ave., Saratov 410049, Russia

²Saratov State Medical University named after V. I. Razumovsky, 112 Bolshaya Kazachia St., Saratov 410012, Russia

³Saratov State University, 83 Astrakhanskaya St., Saratov 410012, Russia

Maria A. Kupryashina, kupryashina_m@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2136-5362>

Elena G. Ponomareva, ponomareva_e@ibppm.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3701-9090>

Alena S. Abdrakhmanova, alena.chernova2018@yandex.ru, <https://orcid.org/0009-0005-2624-9415>

© Купряшина М. А., Пономарева Е. Г., Абдрахманова А. С., 2024



Abstract. Synthetic dyes are widely used in various branches of light industry. Due to the insufficient efficiency of industrial painting processes, a large percentage of dyes end up in the wastewater of enterprises in an unmodified form, which creates a huge risk of environmental pollution with these compounds. Triphenylmethane dyes, in particular malachite green, are toxic, allergenic and carcinogenic compounds. To date, biodegradability of triphenylmethane dyes has been shown for some bacteria and fungi producing phenol oxidase complex enzymes, including soil associative bacteria of the genus *Azospirillum*. Many factors are capable of inducing and inhibiting the biodegradation efficiency, in particular the enzymatic systems that are involved in bleaching processes. In the present work we studied the effects of typical deactivating agents of phenol oxidases, such as H_2O_2 , EDTA, SDS-Na, β -mercaptoethanol, dithiothreitol, Tween, and sodium azide, on the azospirilla's phenol oxidases activity and the ability to decolorize malachite green. It was found that Tween and sodium azide do not have an inhibitory effect on azospirillum enzymes and exhibit a total stabilizing effect on the entire complex. An inhibitory effect from 60 to 100% was noted for laccase and Mn-peroxidase activity under the action of β -mercaptoethanol, dithiothreitol and EDTA, which is directly proportional to the decolorization rate of malachite green. Compared with the latest issues on classical phenol-oxidizing enzymes, our data revealed non-typical properties of the phenol oxidase complex enzymes of azospirillum.

Keywords: *Azospirillum*, phenol oxidases, malachite green, decolorization

Acknowledgements: This work was supported by the Russian Science Foundation (project No. 23-24-00570).

For citation: Kupryashina M. A., Ponomareva E. G., Abdrakhmanova A. S. The effects of phenoloxidase inhibitors on the efficacy of malachite green decolorization by *Azospirillum* bacteria. *Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology*, 2024, vol. 24, iss. 1, pp. 58–66 (in Russian). <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2024-24-1-58-66>, EDN: DNSCSQ

This is an open access article distributed under the terms of Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC-BY 4.0)

Введение

В последние годы особое внимание уделяется токсикологии окружающей среды из-за злоупотребления в использовании синтетических красителей и серьезных последствий от их воздействия на водные и земельные ресурсы [1, 2]. К сожалению, обычные физико-химические методы обработки промышленных стоков, включающие сорбцию, химическую флокуляцию, фильтрацию или коагуляцию, оказались малоэффективны [3, 4]. В качестве альтернативы начались активные исследования редукции красителей различными биологическими объектами. Ранее мы показали, что непатогенные ассоциативные микроорганизмы рода *Azospirillum* обладают фенолоксидазной активностью [5–8]. Окислительная способность бактериальных фенолоксидаз несколько ниже грибных, при этом отмечаются различия не только в кинетических, но и в каталитических свойствах ферментов [9]. Учитывая опыт применения фенолоксидаз в различных отраслях промышленности, первостепенное значение имеет поиск ферментов с нетипичными свойствами [10, 11]. Знания об активаторах и ингибиторах фенолоксидаз актуальны в контексте промышленного применения, так как ряд органических и неорганических соединений, присутствующих в окружающей среде, способен оказывать воздействие на ферментативную активность [12]. Ранее нами обнаружена способность азоспирилл, благодаря наличию пула фенолоксилящих ферментов, обесцвечивать малахитовый зеленый – синтетический краситель трифенилметанового ряда, обладающий мутагенными и канцерогенными

свойствами [13]. Многие факторы способны индуцировать и ингибировать эффективность биodeградации, воздействуя на ферментативные системы бактерий, вовлеченные в процессы обесцвечивания. Выяснение влияния различных эффекторов на активность ферментов фенолоксидазного комплекса и процесс биodeколоризации имеет важное значение для разработки прикладных технологий.

Цель работы – оценка влияния таких соединений, как H_2O_2 , ЭДТА (этилендиаминтетраацетат), ДДС-Na (додецилсульфат натрия), β -меркаптоэтанол, дитиотреитол на активность фенолоксидаз азоспирилл и эффективность деколоризации малахитового зеленого.

Материалы и методы

В настоящей работе в качестве биообъекта был взят штамм *Azospirillum brasilense* SR80 из коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН. Культивирование бактерий проводили в жидкой малатно-солевой среде при 37°C. Для оценки действия типичных деактивирующих агентов фенолоксидаз на уровень ферментативной активности и эффективности обесцвечивания малахитового зеленого, бактерии культивировали в стационарных условиях без постоянного перемешивания в течение 48 ч, далее осаждали центрифугированием в течение 15 мин при 7000 g, супернатант использовали для дальнейших анализов. В эксперимент были взяты соединения: H_2O_2 , ЭДТА, ДДС-Na, β -меркаптоэтанол, дитиотреитол, твин 80 и азид натрия. Вещества вносили в инкубационную смесь в конечной концентрации 2 мМ (концен-



трация была выбрана исходя из данных литературных источников). Оценку влияния данных соединений на активность лакказ, лигнин- и Мп-пероксидаз проводили в соответствии со стандартной методикой [8]. Удельную активность выражали в единицах на 1 мг белка. О содержании белка судили по количественной реакции с реактивом Бредфорд [14]. Образец культуральной жидкости прединкубировали с исследуемым соединением в течение 10 мин при комнатной температуре с последующим измерением удельной активности ферментов. Кинетическое измерение начинали с добавления субстратов в соответствующем буферном растворе. В качестве контроля выступала удельная активность фермента, детектируемая в образцах без внесения исследуемых соединений. Параллельно, для того чтобы подтвердить, что исследуемые соединения не участвуют в ферментативных реакциях с вератриловым спиртом и 2,6-диметоксифенолом, проводили измерение оптической плотности в инкубационной смеси без добавления образца.

Оценку эффективности обесцвечивания малахитового зеленого проводили в 96-луночных планшетах с плоским дном. Сначала в лунки вносили образцы культуральной жидкости, инкубировали с исследуемым соединением в течение 10 мин при комнатной температуре, далее добавляли малахитовый зеленый в конечной концентрации 1мМ. Показания оптической плотности проводили на планшетном спектрофотометре Spark 10 M («Тесан», Швейцария), в режиме фотометрии при 620 нм в цикле 3 измерений с интервалом 3 с при термостатировании при 27°C. Эффективность деколоризации рассчитывали по формуле [15]:

$$\% \text{деградации} = 100 \times \frac{A_{\text{нач}} - A_{\text{кон}}}{A_{\text{нач}}}$$

Эксперименты выполняли минимум в трех повторностях в трех независимых экспериментах, полученные данные обрабатывали с использованием статистического пакета анализа данных программы Excel Microsoft Office XP.

Результаты и их обсуждение

В ходе данной работы было исследовано влияние H_2O_2 , ЭДТА, ДДС-Na, β -меркаптоэтанола, дитиотреитола, твина 80 и азиды натрия на внеклеточную лакказную, лигнин- и Мп-пероксидазную активность азоспирилл и эф-

фективность деколоризации синтетического красителя – малахитового зеленого. В эксперимент был взят штамм *Azospirillum brasilense* SR80, для которого ранее показаны высокие уровни продукции фенолоксилирующих ферментов. В качестве модельного синтетического красителя был взят малахитовый зеленый (тетраметил-4,4-диаминотрифенилметан). Как видно из представленных графиков, типичные деактивирующие агенты фенолоксидаз оказывали как стимулирующее, так и ингибирующее действие на активность ферментов в нашем эксперименте (рис. 1). На эффективность обесцвечивания малахитового зеленого выбранные деактивирующие агенты также оказывали различное влияние (рис. 2).

Наиболее сильным деактивирующим эффектом в отношении всех исследуемых ферментов фенолоксидазного комплекса азоспирилл обладал β -меркаптоэтанол. Широко известно, что многие белки денатурируют в присутствии β -меркаптоэтанола из-за восстановления дисульфидных связей. Поэтому меркаптоэтанол часто используют при исследовании структуры белков, например, для перевода всех молекул белка из олигомерного в мономерное состояние [16]. Прединкубация образцов культуральной жидкости SR80 с меркаптоэтанолом снижала активность лигнин- и Мп-пероксидаз в 1.5 раза (см. рис. 1), в то время как для *Aspergillus terreus*, *Trametes versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium* была показана полная дезактивация лигнин- и Мп-пероксидаз под действием аналогичных концентраций β -меркаптоэтанола [17–19]. Внеклеточная активность лакказы азоспирилл под действием β -меркаптоэтанола инактивировалась на 90% (см. рис. 1), аналогичная тенденция отмечалась для термофильной бактерии *Cohnella* sp. Снижение активности фермента в присутствии β -меркаптоэтанола может быть связано с восстановлением окисленного субстрата сульфгидрильной группой [20]. В то же время присутствие β -меркаптоэтанола в среде культивирования лишь незначительно снижало эффективность деколоризации малахитового зеленого взятым в эксперимент штаммом.

Иная картина наблюдалась в отношении азиды натрия. Для большинства лакказ и пероксидаз лигнинолитических комплексов грибов было показано полное ингибирование ферментативной активности в присутствии азиды натрия [11, 19, 21, 22]. Предполагается, что азид натрия блокирует перенос электронов,

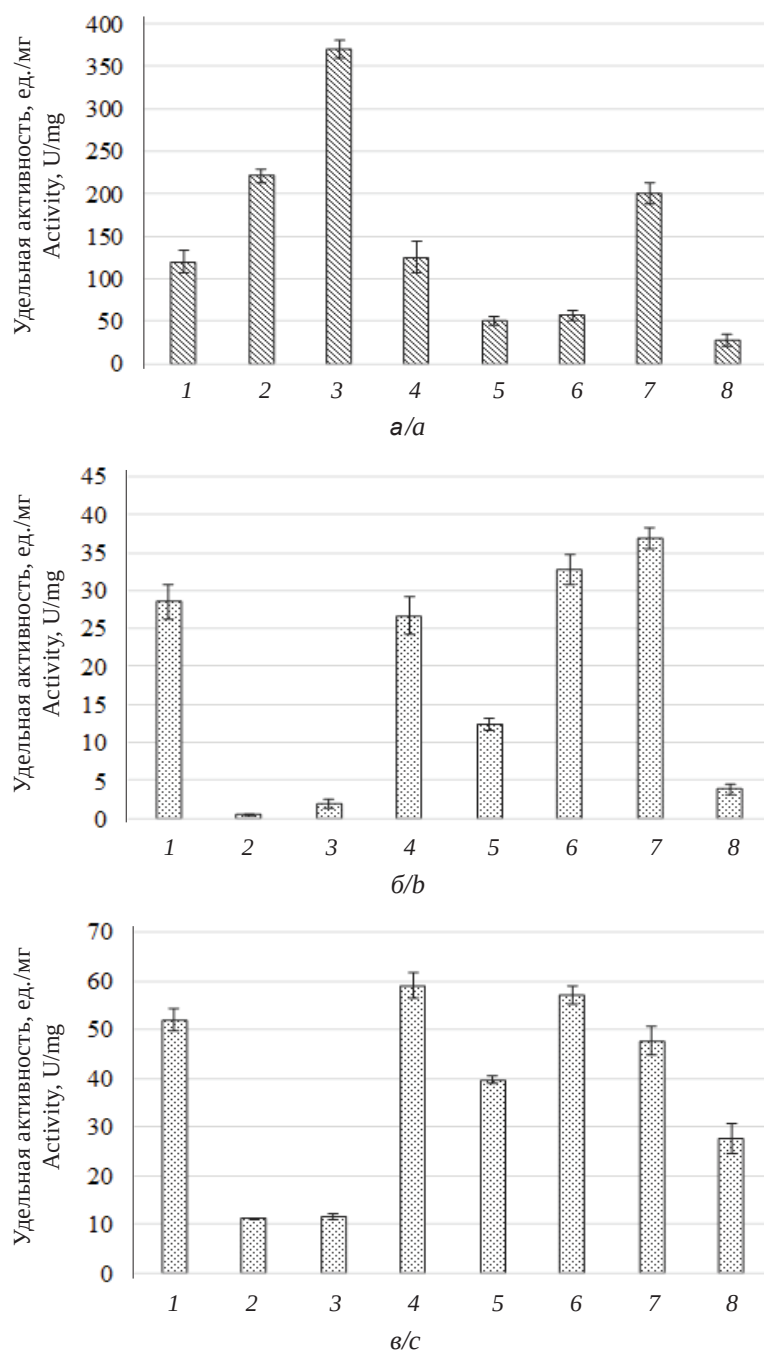


Рис. 1. Удельная активность внеклеточной лигнин-пероксидазы (а), лакказы (б), Мп-пероксидазы (в) *A. brasilense* SR80: 1 – контроль, 2 – ЭДТА, 3 – дитиотрейтол, 4 – азид натрия, 5 – Na-ДДС, 6 – H₂O₂, 7 – твин 80, 8 – β-меркаптоэтанол

Fig. 1. Activity of extracellular lignin peroxidase (a), laccase (b), Mn-peroxidase (c) *A. brasilense* SR80: 1 – control, 2 – EDTA, 3 – dithiothreitol, 4 – sodium azide, 5 – sodium dodecyl sulfate, 6 – H₂O₂, 7 – twin 80, 8 – β-mercaptoethanol

из-за чего фермент теряет свою окислительную способность [23]. NaN₃ снижает активность бактериальных лакказ на 45–48% [20, 24]. Однако для исследуемого штамма установлено лишь незначительное снижение лакказной и

Мп-пероксидазной активности под действием азид натрия, при этом на активность лигнин-пероксидазы данное соединение не оказывало влияния вовсе (см. рис. 1). Стоит отметить, что на лакказную активность *Bacillus* sp. NaN₃ так-

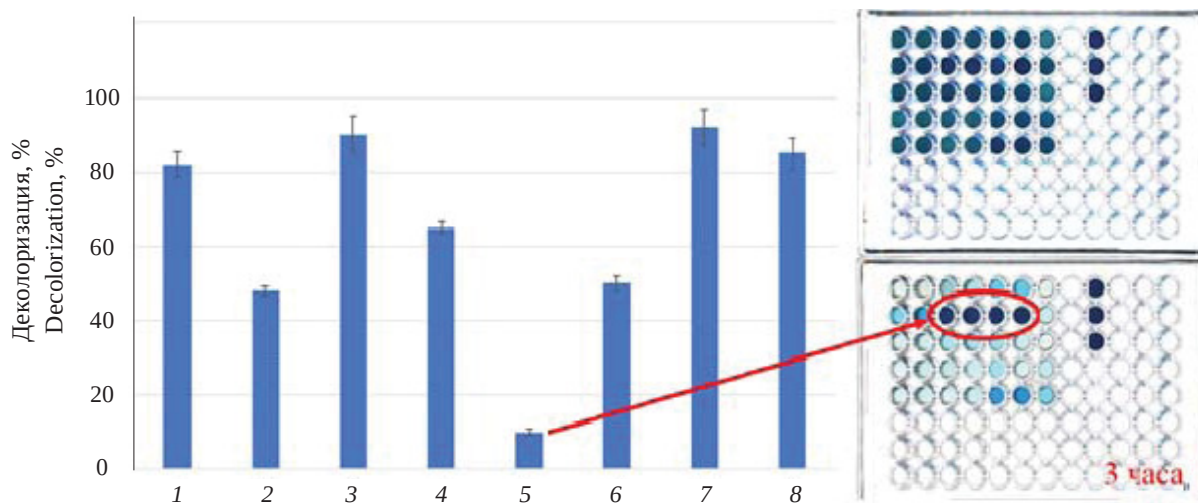


Рис. 2. Эффективность деколоризации малахитового зеленого *A. brasilense* SR80: 1 – контроль, 2 – ЭДТА, 3 – дитиотрейтол, 4 – азид натрия, 5 – Na-ДДС, 6 – H₂O₂, 7 – твин 80, 8 – β-меркаптоэтанол
Fig. 2. Efficiency of decolorization of malachite green *A. brasilense* SR80: 1 – control, 2 – EDTA, 3 – dithiothreitol, 4 – sodium azide, 5 – sodium dodecyl sulfate, 6 – H₂O₂, 7 – twin 80, 8 – β-mercaptoethanol

же не оказывал никакого эффекта [24]. Обесцвечивание синтетического красителя в среде снижалось на 30% (см. рис. 2).

Согласно данным литературы, также достаточно сильным ингибитором общей фенолоксидазной активности является дитиотрейтол [11]. Однако в ряде работ показано, что подавление активности лакказы дитиотрейтолом имеет обратимый характер, и с увеличением времени инкубации в реакционной смеси наблюдается образование окисленных катион-радикалов. Предполагается, что в данном случае дитиотрейтол выступает не в роли ингибитора ферментативной реакции, а является конкурентом по отношению к хромагенному субстрату [11]. Активность Mn-пероксидазы снижалась в 4.3 раза в присутствии дитиотрейтола (см. рис. 1), аналогичное влияние отмечалось и для грибных Mn-пероксидаз [25, 26]. В то же время данное вещество проявляло стимулирующий эффект в отношении лигнин-пероксидазы, в ходе эксперимента мы детектировали увеличение ферментативной активности более, чем в 2.5 раза (см. рис. 1). Повышенная активность фермента в присутствии дитиотрейтола может указывать на важную роль восстановленных SH-групп в осуществлении каталитического процесса. Также нами не отмечалось снижение способности бактерии к деколоризации красителя.

Этилендиаминтетраацетат является хелатором ионов двухвалентных металлов, в связи

с чем выступает в роли ингибитора многих металлсодержащих ферментов, и, в свою очередь, не обладает строгой специфичностью к блокированию активности фенолоксидаз. Как для грибных, так и для бактериальных лакказ ЭДТА является сильнейшим ингибитором, полностью подавляющим активность фермента даже при низких концентрациях (0.02–0.1 мМ) [11, 20]. Для внеклеточной лакказной активности азоспирилл также отмечалось полное ингибирование активности фермента под действием ЭДТА. В работе Vandana с соавторами при исследовании стимулирующего/ингибирующего действия данного соединения в отношении лигнин-пероксидазы *Phanerochaete chrysosporium* отмечалось нетипичное увеличение активности фермента [19], аналогичные данные были получены в нашей работе. Лигнин-пероксидазная активность азоспирилл в условиях эксперимента увеличивалась в 3 раза (см. рис. 1). Во многих работах сообщается о частичном ингибировании активности Mn-пероксидазы ЭДТА за счет образования комплекса с железопропорферином, являющимся кофактором фермента [17, 18, 22]. Для Mn-пероксидазы азоспирилл было характерно снижение активности фермента до 70% от начального уровня. Снижение эффективности обесцвечивания красителя отмечалось более чем на 50% от контроля (см. рис. 2).

Перекись водорода, несмотря на то что она является природным субстратом как лигнин-,



так и Мп-пероксидаз, способна ингибировать данные ферменты. Показано, что в случае внесения большего количества перекиси водорода лигнинолитические пероксидазы инактивируются с разрушением гема. При этом грибные лигнин-пероксидазы более чувствительны к инактивации перекисью водорода, по сравнению с Мп-пероксидазами [25]. В ходе нашего исследования при прединкубировании исследуемых образцов культуральной жидкости азоспирилл с перекисью водорода отмечалось снижение лигнин-пероксидазной активности более, чем на 50% (см. рис. 1). При этом эффективность обесцвечивания красителя резко снижалась (см. рис. 2).

Лакказная активность исследуемого штамма азоспирилл незначительно повышалась в присутствии перекиси водорода, в то время как для грибных лакказ *Psilocybe castanella*, *Lentinus crinitus*, *Trametes villosa*, *Pleurotus ostreatus*, *Aspergillus niger* показана инактивация ферментативной активности на 40–80% под воздействием H_2O_2 (см. рис. 1) [26].

При исследовании влияния поверхностно-активных веществ на активность ферментов фенолоксидазного комплекса в качестве дезактивирующего агента был выбран твин 80. Как оказалось, присутствие данного соединения в инкубационной среде незначительно влияло на обесцвечивание малахитового зеленого. Показано, что на фенолоксидазную активность актиномицета *Nonomuraea gerenzanensis* сильно влияло присутствие твина 80 в реакционной среде, инактивируя ферменты в 2 раза [27]. Также резкий ингибирующий эффект отмечался для лакказ и Мп-пероксидаз *Trametes polyzona* [22]. Полученные данные о влиянии твина на ферменты фенолоксидазного комплекса азоспирилл согласуются с работой Shafeia с соавторами, в которой показано стимулирующее действие на активность бактериальных лакказ от внесения в инкубационную смесь данного поверхностного вещества в концентрации от 0.1 до 5 мМ [20].

Неожиданные данные были получены при исследовании влияния другого поверхностно-активного вещества, а именно ДДС-Na, на активность фенолоксидаз азоспирилл (см. рис. 1). Согласно данным литературы, ДДС-Na в концентрации от 0.5 до 25 мМ стимулирует увеличение активности лакказы термофильной бактерии *Cohnella* на 41%, а также вызывает индукцию активности *A. lipoferum*. [20, 28, 29].

Однако полученные нами данные свидетельствуют о снижении ферментативной активности как оксидаз, так и пероксидаз фенолоксидазного комплекса азоспирилл при воздействии ДДС-Na, что характерно для грибных ферментов [30]. При этом происходило практически полное ингибирование деколоризации малахитового зеленого (см. рис. 2).

Заключение

Таким образом, в ходе проведенной экспериментальной работы исследовано влияние типичных деактивирующих агентов фенолоксидаз, таких как H_2O_2 , ЭДТА, ДДС-Na, β -меркаптоэтанол, дитиотреитол, твин и азид натрия, на степень деколоризации малахитового зеленого и активность лакказ, лигнин- и Мп-пероксидаз. Обнаружено, что твин и азид натрия не оказывают ингибирующего воздействия на ферменты азоспирилл и проявляют стабилизирующее действие на весь комплекс в целом. Типичные деактивирующие агенты фенолоксидаз, такие как H_2O_2 , ЭДТА, ДДС-Na, β -меркаптоэтанол, дитиотреитол, твин и азид натрия, оказывали как стимулирующее, так и ингибирующее действие на внеклеточную ферментативную активность азоспирилл и обесцвечивание малахитового зеленого. Ингибирующий эффект от 60 до 100% отмечен для лакказной и Мп-пероксидазной активности под действием β -меркаптоэтанола, дитиотреитола и ЭДТА, что прямо пропорционально отражается на степени деколоризации малахитового зеленого. Показано, что данные соединения не вызывают дестабилизации лигнин-пероксидазы, что свидетельствует об атипичном строении молекулы фермента, вследствие чего белок не теряет активность при взаимодействии с хелатором и не денатурирует из-за восстановления дисульфидных связей. Отмечено, что аналогичные хелаторы и поверхностно-активные вещества приводят к полной дезактивации процесса обеспечения синтетических красителей для многих биообъектов, для *A. brasilense* SR80 100% ингибирование дегградации малахитового зеленого установлено только для ДДС-Na. При сравнении полученных сведений с данными литературы для ферментов фенолоксидазного комплекса азоспирилл выявлены свойства не характерные для классических фенолоксиляющих и лигнинолитических ферментов.



Список литературы

1. Pearce C. I., Lloyd J. R., Guthrie J. T. The removal of color from textile wastewater using whole bacterial cells: A review // *Dyes Pigments*. 2003. Vol. 58. P. 179–196. [https://doi.org/10.1016/S0143-7208\(03\)00064-0](https://doi.org/10.1016/S0143-7208(03)00064-0)
2. Mourid E., Lakraimi M., Khatlaji E. El., Benaziz L., Berraho M. Removal of remazol brilliant blue R from aqueous solution by adsorption using a calcined layered double hydroxide [Zn₂-Al-CO₃] // *JMES*. 2017. Vol. 8, № 3. P. 921–930. <https://doi.org/10.1007/s42452-020-2063-2>
3. Forgacs E., Cserhati T., Oros G. Removal of synthetic dyes from wastewaters: A review // *Environment International*. 2004. Vol. 30. P. 953–971. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2004.02.001>
4. Jadhav J. P., Kalyani D. C., Telke A. A., Phugare S. S., Govindwar S. P. Evaluation of the efficacy of a bacterial consortium for the removal of color, reduction of heavy metals, and toxicity from textile dye effluent // *Bioresour. Technol.* 2010. № 101. P. 165–173. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.08.027>
5. Никитина В. Е., Ветчинкина Е. П., Пономарева Е. Г., Гоголева Ю. В. Фенолоксидазная активность бактерий рода *Azospirillum* // *Микробиология*. 2010. Т. 79, № 3. С. 344–351.
6. Купряшина М. А., Селиванов Н. Ю., Никитина В. Е. Выделение и очистка Mn-пероксидазы *Azospirillum brasilense* Sp245 // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2012. Т. 48, № 1. С. 23–26.
7. Петров С. В., Купряшина М. А., Пономарева Е. Г., Воробьева С. А., Глинская Е. В., Никитина В. Е. Скрининг бактерий рода *Azospirillum* по способности к продукции внеклеточной лигнин-пероксидазы и деградации модельных соединений лигнина и азокрасителей // *Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология*. 2017. Т. 17, вып. 2. С. 170–176. <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2017-17-2-170-176>
8. Купряшина М. А., Петров С. В., Пономарева Е. Г., Никитина В. Е. Лигнинолитическая активность бактерий родов *Azospirillum* и *Niveispirillum* // *Микробиология*. 2015. Т. 84, № 6. С. 691–696. <https://doi.org/10.7868/S0026365615060051>
9. Bugg T. D. H., Ahmad M., Hardiman E. M., Rahmanpour R. Pathways for degradation of lignin in bacteria and fungi // *Nat. Prod. Rep.* 2011. Vol. 28. P. 1883–1896. <https://doi.org/10.1039/c1np00042j>
10. Falade A. O., Eyisia O. A. L., Mabinya L. V., Nwodo U. U., Okoh A. I. Peroxidase production and ligninolytic potentials of freshwater bacteria *Raoultella ornithinolytica* and *Ensifera dhaerens* // *Biotechnol. Report*. 2017. Vol. 16. P. 2–17. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2017.10.001>
11. Falade A. O., Nwodo U. U., Iweriebor B. C., Green E., Mabinya L. V., Okoh A. I. Lignin peroxidase functionalities and prospective applications // *Microbiology Open*. 2017. 6:e00394. <https://doi.org/10.1002/mbo3.394>
12. Ahmad M., Taylor C. R., Pink D., Burton K., Eastwood D., Bending G. D., Bugg T. D. H. Development of novel assays for lignin degradation: Comparative analysis of bacterial and fungal lignin degraders // *Mol. Biosyst.* 2010. № 6. P. 815–821. <https://doi.org/10.1039/b908966g>
13. Купряшина М. А., Пономарева Е. Г., Никитина В. Е. Способность бактерий рода *Azospirillum* к деколоризации синтетических красителей // *Микробиология*. 2020. Т. 89, № 4. С. 453–461. <https://doi.org/10.31857/S0026365620040084>
14. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microorganisms qualities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* 1976. Vol. 72. P. 248–254.
15. Nidadavolu S. B., Gudikandula K., Pabba S. K., Maringanti Ch. S. Decolorization of triphenyl methane dyes by *Fomitopsis feei* // *Natural Science*. 2013. Vol. 5. P. 30–35. <https://doi.org/10.4236/ns.2013.56A005>
16. Banker D. D. Enzymes – a review // *Indian J. Med. Sci.* 1998. Vol. 52, № 6. P. 265–271. PMID: 9849038.
17. Kanayama N., Tohru S., Keiichi K. Purification and characterization of an alkaline manganese peroxidase from *Aspergillus terreus* LD-1 // *J. Biosci. Bioeng.* 2002. Vol. 93. P. 405–410. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(02\)80075-5](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(02)80075-5)
18. Asgher M., Iqbal H. M. N. Characterization of a novel manganese peroxidase purified from solid state culture of *Trametes versicolor* IBL-04 // *BioResources*. 2011. Vol. 6. P. 4302–4315. <https://doi.org/10.15376/biores.6.4.4317-4330>
19. Vandana T., Kumar S., Swaraj S., Manpal S. Purification, characterization, and biodelignification potential of lignin peroxidase from immobilized *Phanerochaete chrysosporium* // *BioResources*. 2019. Vol. 14. P. 5380–5399. <https://doi.org/10.15376/biores.14.3.5380-5399>
20. Shafeia M., Afzalib F., Karkhanea A. A., Ebrahimi S. M., Haghbeend K., Aminzadeha S. *Cohnella* sp. A01 laccase: Thermostable, detergent resistant, anti-environmental and industrial pollutants enzyme // *Heliyon*. 2017. Vol. 5. e02543. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02543>
21. Parveen K., Usha K., Visvanath B., Reddy B. Kinetic properties of manganese peroxidase from the mushroom *Stereum ostrea* and its ability to decolorize dyes // *J. Microbiol. Biotechnol.* 2012. Vol. 22. P. 1540–1548. <https://doi.org/10.4014/jmb.1112.12011>
22. Lueangjaroenkit P., Teerapatsaku C., Sakka K., Sakka M., Kimura T., Kunitake E., Chitradon L. Two manganese peroxidases and a laccase of *Trametes polyzona* KU-RNW027 with novel properties for dye and pharmaceutical product degradation in redox mediator-free system // *Mycobiology*. 2019. Vol. 47, № 2. P. 217–229. <https://doi.org/10.1080/12298093.2019.1589900>
23. Zhou X., Qu Y., Kim B. H. Effects of azide on electron transport of exoelectrogens in air-cathode microbial fuel cells // *Bioresour. Technol.* 2014. Vol. 169. P. 265–270. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.07.012>
24. Siroosi M., Amoozegar M. A., Khajeh K. Purification and characterization of an alkaline chloride-tolerant laccase from a halotolerant bacterium *Bacillus* sp. strain WT // *J. Mol. Catal. B. Enzym.* 2016. Vol. 134. P. 89–97. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2016.10.001>



25. Valderrama B., Ayala M., Vazquez-Duhalt R. Suicide inactivation of peroxidases and the challenge of engineering more robust enzymes // *Chem. Biol.* 2002. Vol. 9. P. 555–565. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(02\)00149-7](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(02)00149-7)
26. Ballaminut N., Yamanaka R., Gomes Machado K. Interference of a commercial catalase preparation in laccase and peroxidase activities // *Braz. Arch. Biol. Technol.* 2009. Vol. 52, № 5. P. 1193–1198. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132009000500017>
27. Casciello C., Tonin F., Berini F., Fasoli E., Marinelli F., Pollegioni L., Rosini E. A valuable peroxidase activity from the novel species *Nonomuraea gerenzanensis* growing on alkali lignin // *Biotechnol. Rep. (Amst)*. 2017. Vol. 13. P. 49–57. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2016.12.005>
28. Diamantidis G., Effosse A., Potier P., Bally R. Purification and characterization of the first bacterial laccase in the rhizospheric bacterium *Azospirillum lipoferum* // *Soil Biol. Biochem.* 2000. Vol. 32. P. 919–927. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(99\)00221-7](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(99)00221-7)
29. Alexandre G., Jacoud C., Faure D. Population dynamics of a motile and a non-motile *Azospirillum lipoferum* strain during rice colonization and motility variation in the rhizosphere // *FEMS Microbiol. Ecol.* 1996. Vol. 19. P. 271–278. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1996.tb00219.x>
30. Pollegioni L., Tonin F., Rosini E. Lignin-degrading enzymes // *FEBS J.* 2015. Vol. 282. P. 1190–1213. <https://doi.org/10.1111/febs.13224>
1. Pearce C. I., Lloyd J. R., Guthrie J. T. The removal of color from textile wastewater using whole bacterial cells: A review. *Dyes Pigments*, 2003, vol. 58, pp. 179–196. [https://doi.org/10.1016/S0143-7208\(03\)00064-0](https://doi.org/10.1016/S0143-7208(03)00064-0)
2. Mourid E., Lakraimi M., Khattabi E. El., Benaziz L., Berraho M. Removal of remazol brilliant blue R from aqueous solution by adsorption using a calcined layered double hydroxide [Zn₂-Al-CO₃]. *JMES*, 2017, vol. 8, no. 3, pp. 921–930. <https://doi.org/10.1007/s42452-020-2063-2>
3. Forgacs E., Cserhati T., Oros G. Removal of synthetic dyes from wastewaters: A review. *Environment International*, 2004, vol. 30, pp. 953–971. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2004.02.001>
4. Jadhav J. P., Kalyani D. C., Telke A. A., Phugare S. S., Govindwar S. P. Evaluation of the efficacy of a bacterial consortium for the removal of color, reduction of heavy metals, and toxicity from textile dye effluent. *Bioresour. Technol.*, 2010, no. 101, pp. 165–173. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.08.027>
5. Nikitina V. E., Vetchinkina E. P., Ponomareva E. G., Gogoleva Yu. V. Phenol oxidase activity in bacteria of the genus *Azospirillum*. *Microbiology*, 2010, vol. 79, no. 3, pp. 327–333 (in Russian).
6. Kupryashina M. A., Selivanov N. Yu., Nikitina V. E. Isolation and purification of Mn-peroxidase from *Azospirillum brasilense* Sp245. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2012, vol. 48, pp. 17–20 (in Russian).
7. Petrov S. V., Kupriashina M. A., Ponomareva E. G., Vorobieva S. A., Glinskaya E. V., Nikitina V. E. Screening of Genus *Azospirillum* for their ability to produce extracellular lignin-peroxidase and the degradation of model lignin compounds and azo dyes. *Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology*, 2017, vol. 17, iss. 2, pp. 170–176 (in Russian). <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2017-17-2-170-176>
8. Kupryashina M. A., Petrov S. V., Ponomareva E. G., Nikitina V. E. Ligninolytic activity of bacteria of the genera *Azospirillum* and *Niveispirillum*. *Microbiology*, 2015, vol. 84, no. 6, pp. 791–795 (in Russian). <https://doi.org/10.1134/S0026261715060041>
9. Bugg T. D. H., Ahmad M., Hardiman E. M., Rahmanpour R. Pathways for degradation of lignin in bacteria and fungi. *Nat. Prod. Rep.*, 2011, vol. 28, pp. 1883–1896. <https://doi.org/10.1039/c1np00042j>
10. Falade A. O., Eyisia O. A. L., Mabinya L. V., Nwodo U. U., Okoh A. I. Peroxidase production and ligninolytic potentials of freshwater bacteria *Raoultella ornithinolytica* and *Ensifera dhaerens*. *Biotechnol. Report.*, 2017, vol. 16, pp. 2–17. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2017.10.001>
11. Falade A. O., Nwodo U. U., Iweriebor B. C., Green E., Mabinya L. V., Okoh A. I. Lignin peroxidase functionalities and prospective applications. *Microbiology Open.*, 2017, 6:e00394. <https://doi.org/10.1002/mbo3.394>
12. Ahmad M., Taylor C. R., Pink D., Burton K., Eastwood D., Bending G. D., Bugg T. D. H. Development of novel assays for lignin degradation: Comparative analysis of bacterial and fungal lignin degraders. *Mol. Biosyst.*, 2010, no. 6, pp. 815–821. <https://doi.org/10.1039/b908966g>
13. Kupryashina M. A., Ponomareva E. G., Nikitina V. E. Ability of bacteria of the genus *Azospirillum* to decolorize synthetic dyes. *Microbiology*, 2020, vol. 89, no. 4, pp. 451–458 (in Russian). <https://doi.org/10.1134/S0026261720040074>
14. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microorganisms qualities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 1976, vol. 72, pp. 248–254.
15. Nidadavolu S. B., Gudikandula K., Pabba S. K., Maringanti Ch. S. Decolorization of triphenyl methane dyes by *Fomitopsis feei*. *Natural Science*, 2013, vol. 5, pp. 30–35. <https://doi.org/10.4236/ns.2013.56A005>
16. Banker D. D. Enzymes – a review. *Indian J. Med. Sci.*, 1998, vol. 52, no. 6, pp. 265–271. PMID: 9849038.
17. Kanayama N., Tohru S., Keichi K. Purification and characterization of an alkaline manganese peroxidase from *Aspergillus terreus* LD-1. *J. Biosci. Bioeng.*, 2002, vol. 93, pp. 405–410. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(02\)80075-5](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(02)80075-5)
18. Asgher M., Iqbal H. M. N. Characterization of a novel manganese peroxidase purified from solid state culture of *Trametes versicolor* IBL-04. *BioResources*, 2011, vol. 6, pp. 4302–4315. <https://doi.org/10.15376/biores.6.4.4317-4330>



19. Vandana T., Kumar S., Swaraj S., Manpal S. Purification, characterization, and biodelignification potential of lignin peroxidase from immobilized *Phanerochaete chrysosporium*. *BioResources*, 2019, vol. 14, pp. 5380–5399. <https://doi.org/10.15376/biores.14.3.5380-5399>
20. Shafieia M., Afzalib F., Karkhanea A. A., Ebrahimi S. M., Haghbeend K., Aminzadeha S. *Cohnella* sp. A01 laccase: Thermostable, detergent resistant, anti-environmental and industrial pollutants enzyme. *Heliyon*, 2017, vol. 5, e02543. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02543>
21. Parveen K., Usha K., Visvanath B., Reddy B. Kinetic properties of manganese peroxidase from the mushroom *Stereum ostrea* and its ability to decolorize dyes. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 2012, vol. 22, pp. 1540–1548. <https://doi.org/10.4014/jmb.1112.12011>
22. Lueangjaroenkit P., Teerapatsaku C., Sakka K., Sakka M., Kimura T., Kunitake E., Chitradon L. Two manganese peroxidases and a laccase of *Trametes polyzona* KU-RNW027 with novel properties for dye and pharmaceutical product degradation in redox mediator-free system. *Mycobiology*, 2019, vol. 47, no. 2, pp. 217–229. <https://doi.org/10.1080/12298093.2019.1589900>
23. Zhou X., Qu Y., Kim B. H. Effects of azide on electron transport of exoelectrogens in air-cathode microbial fuel cells. *Bioresour. Technol.*, 2014, vol. 169, pp. 265–270. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.07.012>
24. Siroosi M., Amoozegar M. A., Khajeh K. Purification and characterization of an alkaline chloride-tolerant laccase from a halotolerant bacterium *Bacillus* sp. strain WT. *J. Mol. Catal. B. Enzym.*, 2016, vol. 134, pp. 89–97. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2016.10.001>
25. Valderrama B., Ayala M., Vazquez-Duhalt R. Suicide inactivation of peroxidases and the challenge of engineering more robust enzymes. *Chem. Biol.*, 2002, vol. 9, pp. 555–565. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(02\)00149-7](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(02)00149-7)
26. Ballaminut N., Yamanaka R., Gomes Machado K. Interference of a commercial catalase preparation in laccase and peroxidase activities. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 2009, vol. 52, no. 5, pp. 1193–1198. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132009000500017>
27. Casciello C., Tonin F., Berini F., Fasoli E., Marinelli F., Pollegioni L., Rosini E. A valuable peroxidase activity from the novel species *Nonomuraea gerenzanensis* growing on alkali lignin. *Biotechnol. Rep. (Amst)*, 2017, vol. 13, pp. 49–57. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2016.12.005>
28. Diamantidis G., Effosse A., Potier P., Bally R. Purification and characterization of the first bacterial laccase in the rhizospheric bacterium *Azospirillum lipoferum*. *Soil Biol. Biochem.*, 2000, vol. 32, pp. 919–927. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(99\)00221-7](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(99)00221-7)
29. Alexandre G., Jacoud C., Faure D. Population dynamics of a motile and a non-motile *Azospirillum lipoferum* strain during rice colonization and motility variation in the rhizosphere. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 1996, vol. 19, pp. 271–278. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1996.tb00219.x>
30. Pollegioni L., Tonin F., Rosini E. Lignin-degrading enzymes. *FEBS J.*, 2015, vol. 282, pp. 1190–1213. <https://doi.org/10.1111/febs.13224>

Поступила в редакцию 07.08.2023; одобрена после рецензирования 06.10.2023; принята к публикации 09.10.2023
The article was submitted 07.08.2023; approved after reviewing 06.10.2023; accepted for publication 09.10.2023