

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра биохимии и биофизики

**ИЗУЧЕНИЕ СПОСОБНОСТИ К БИОДЕГРАДАЦИИ
АЗОКРАСИТЕЛЕЙ БАКТЕРИЯМИ *HALOMONAS CASEINILYTICA***

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студента 4 курса 421 группы

Направления подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология

Биологического факультета

Урюпиной Дарьи Леонидовны

Научный руководитель:

д.б.н., проф.




30.05.2023

С.А. Коннова

Зав. кафедрой:

д.б.н., проф.



30.05.2023

С.А. Коннова

Саратов 2023

ВВЕДЕНИЕ

Современными темпами индустриализации обусловлены ежегодно растущие объемы производства синтетических красителей, которые находят свое применение в текстильной, косметической, полиграфической, фармацевтической и пищевой промышленности. Вследствие недостаточной эффективности процессов окраски, большой процент красителей попадает в сточные воды предприятий в неизменном виде, что является причиной активного загрязнения окружающей среды данными соединениями. К сожалению, обычные физико-химические методы обработки промышленных стоков, включающие сорбцию, химическую флокуляцию, фильтрацию или коагуляцию, малоэффективны. В целях минимизации экологических рисков в последние годы активно ведется поиск и разработка новых методов биоредукции синтетических красителей. Биодеколоризация осуществляется либо путем адсорбции на микробной биомассе, либо ферментативной деструкцией. До 60% от производимых красителей это азокрасители, в связи с этим наибольший ряд работ посвящен изучению деколоризации именно этой группы. Исследований по биодеградации трифенилметановых и антрахиноновых красителей значительно меньше, однако они представляют серьезную опасность для окружающей среды и здоровья человека, так как многие из них обладают канцерогенными, мутагенными и даже тератогенными свойствами.

Красители могут существенно влиять на фотосинтетическую активность водных организмов из-за снижения проникновения света, а также могут быть токсичными для некоторых водных организмов из-за присутствия ароматических соединений, металлов, хлоридов и т. д.

В последнее десятилетие появились факты и доказательства участия ферментов фенолоксидазного комплекса грибов и бактерий в деградации красителей.

Цель данной работы: выявление способности к биодegradации азокрасителей амидо-черного 10Б и кислотного хрома темно-синего бактериями *Halomonascaseinilytica33S7*.

Задачи исследования:

1. Оптимизация состава питательной среды, а также продолжительности выращивания *H. caseinilytica33S7* для реализации функции деградации азокрасителей.
2. Сравнительная характеристика способности к биодegradации различных концентраций красителей амидо-черного 10Б и кислотного хрома темно-синего культурой *H. caseinilytica33S7*.

Объект исследования *H. caseinilytica33S7* изолирован из образцов соли озера Карун (Египет, 29°27'13с.ш. 30°34'51 в.д.), среди других экстремальных галофилов – экзополисахарид-продуцирующих бактерий. Культура любезно предоставлена авторами – сотрудниками лаборатории биохимии Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов, ФИЦ «Саратовский научный центр РАН» (ИБФРМ РАН) [50].

Поддержание культуры проводили на агаризованной среде ГРМ следующего состава сухих компонентов из расчета г/л: панкреатический гидролизат рыбной муки (ПГРМ) – 20, дрожжевой экстракт – 2, калия сульфат – 10, магния хлорид – 1,4, микробиологический агар – 10±3, с добавлением 5% NaCl. Среду стерилизовали в течении 30 минут при 121°C.

Посевным материалом служила 24-часовая культура, выращенная на среде того же состава, в термостате при температуре 37°C.

В качестве исследуемых азокрасителей были выбраны амидо-черный 10Б и кислотный хром темно-синий.

Выявление способности культуры к деколоризации диазокрасителей выполняли в эксперименте на чашках Петри, со средой голодный агар. В среду добавляли 5% NaCl, и стерильные водные растворы амидо-черного 10Б с концентрацией 25 мг/л и 12,5 мг/л и кислотного хрома темно-синего с концентраций 100 и 50 мг/л. В среде с соблюдением стерильности вырезали

лунки диаметром 2 мм, куда добавляли взвесь 0,1 мл исследуемых бактерий (10^8 клеток/мл) в физиологическом растворе (0,9% растворе NaCl). Инкубировали чашки в термостате при 37°C в течение 4 суток, после чего фиксировали появление зон просветления красителя вокруг колоний.

Для количественной оценки биодеградационного потенциала использовали жидкую среду Бушнелла-Хааса [30] следующего состава [г/л]: NaCl -50; NH_4NO_3 -1; K_2HPO_4 - 1; KH_2PO_4 - 1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,2; CaCl_2 - 0,02; FeCl_3 - следы.

Для стимуляции роста бактерий *H. caseinilytica* 33S7 в качестве источника углерода была добавлена глюкоза в концентрации 5 г/л.

Инокулировали среду взвесью изучаемой культуры. Инокулят выращивали в жидкой среде LB следующего состава [г/л]: пептон - 10, дрожжевой экстракт - 5, NaCl - 50, глюкоза - 20. Среду стерилизовали в течении 30 минут при 1 атмосфере (121°C). Раствор глюкозы стерилизовали отдельно при 0,5 атм.

В опытные колбы добавляли различные концентрации красителей, стерилизованных при 1 атмосфере.

Активность микроорганизмов по отношению к красителям исследовали, выращивая бактерии в жидкой питательной среде Бушнелла-Хааса при 37°C с добавлением их в концентрациях, представленных в таблице 1[51]:

Таблица 1 –Используемые в исследованиях концентрация исследуемых красителей

Краситель	Концентрация [мг/л]
Амидо-черный Б	25
Амидо-черный Б	12,5
Кислотный хром темно-синий	50
Кислотный хром темно-синий	100

Культивирование микроорганизмов проводили в колбах в течение 4 и 7-ми суток. Спустя 7 суток отбирали по 12 мл взвеси клеток, клетки отделяли от культуральной жидкости центрифугированием при 10 000 об/мин в течение 15-ти минут и рассчитывали уровень деколоризации (D) красителя по оптической плотности супернатанта при длине волны 499 нм по формуле [34]:

$$D = \frac{D_1}{D_2} * 100\% ,$$

где D_1 – оптическая плотность среды в контрольной колбе, которая в течение 7 суток инкубировалась в термостате без инокуляции бактериями;

D_2 – финальная оптическая плотность.

Измерение оптической плотности проводилось с помощью фотоэлектроколориметра ФЭК - (ЛОМО, Россия).

Был проведен спектрофотометрический анализ красителя амидо-черного 10Б для получения сведений о поглощающей способности и оценки эффективности деколоризации красителя.

Бакалаврская работа включает содержание, введение, 3 главы (обзор литературы, материалы и методы, результаты исследований и их обсуждение), заключение, выводы и список использованных источников, включающий 54 источников на русском и английском языках. Работа изложена на 50 страницах машинописного текста. Работа проиллюстрирована 13 рисунками и 6 таблицами.

Основное содержание работы. Штамм *H. caseinilytica*33S7, изолированный из образцов соли озера Карун (Египет, 29°27'13 с.ш. 30°34'51 в.д.), среди других экстремальных галофилов – экзополисахарид-продуцирующих бактерий, был выбран в качестве объекта исследования. Культура любезно предоставлена авторами – сотрудниками лаборатории биохимии Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов, ФИЦ «Саратовский научный центр РАН» (ИБФРМ РАН).

В предварительном эксперименте на чашках Петри культура была проверена на способность деколоризовать диазокрасители. Для этого в среду с голодным агаром добавляли 5% NaCl и стерильные растворы амидо-черного 10Б (25 мг/л и 12,5 мг/л) и кислотного хрома темно-синего в концентрациях (100 и 50 мг/л). В среде с соблюдением стерильности вырезали лунки диаметром 2 мм, куда добавляли взвесь 0,1 мл исследуемых бактерий (10^8 клеток/мл) в физиологическом растворе (0,9% растворе NaCl). Инкубировали чашки в термостате при 37°C в течение 4 суток, после чего фиксировали вокруг колоний появление зон просветления, для кислотного хрома темно-синего 0,3 см, а для амидо-черного 10Б 0,2 см. Это свидетельствует о том, что экстраклеточно синтезируются ферменты, расщепляющие выбранные азокрасители.

Поддержание культуры проводилось в чашках Петри на среде ГРМ с добавлением 5% NaCl.

Исследования способности культуры *H. caseinilytica* 33S7 к деколоризации (обесцвечиванию) диазокрасителей выполняли на среде Бушнелла-Хааса [30]. Выбор минеральной среды с солями обоснован отсутствием в ней дополнительных источников углерода.

Для стимуляции роста бактерий *H. caseinilytica* 33S7 в качестве источника углерода была добавлена глюкоза в концентрации 5 г/л. Это было необходимо для наращивания биомассы, так как в ряде работ было показано, что данные микроорганизмы обладают механизмом регуляции численности популяции, известным как quorum sensing [52], т.е. была необходимость стимуляции роста бактерий на начальной стадии роста, для создания достаточной плотности клеток в популяции.

Также был проведен ряд экспериментов без добавления глюкозы, чтобы определить способность штамма к использованию красителей в качестве единственного источника углерода.

Эксперимент производился на двух красителях – амидо-черный 10Б и кислотный хром темно-синий. Краситель амидо-черный 10Б (AmidoBlack 10B)

и кислотный хром темно-синий (AcidChromeDarkBlue) были выбраны в качестве модельных для исследований способности *H. caseinilytica* к биодegradации азокрасителей по следующим свойствам:

1. Красители широко используются в различных отраслях, включая медицину, биологию, текстильную и пищевую промышленность. Их деградация может иметь большое значение для очистки воды и земельных ресурсов от загрязнения сточными водами этих предприятий.
2. Устойчивость к деградации: краситель амидо-черный Б трудно поддается биологической деградации. Поэтому, способность бактерий к деградации этого красителя может быть показателем высокого их потенциала в отношении других более легко разлагаемых красителей.
3. Наличие красителя кислотного хром темно-синего может быть легко выявлено в спектрофотометрических анализах, что делает его удобным для определения эффективности деградации.

Для культивирования микроорганизмов были выбраны периоды длительностью 4 и 7 суток на основе литературных данных. Кроме того, данный период культивирования позволяет достичь частичной деколоризации, что свидетельствует об эффективной работе микроорганизмов в выбранном сроке[53].

Для выравнивания посевного материала по количеству клеток, вносимых в каждый эксперимент с красителями, в стерильных условиях проводилось разбавление биомассы на денситометре и была равно $15,0 \cdot 10^8$ клеток/см³.

После четырех и семи суток выращивания бактерий по 2 мл взвеси клеток, вносили в предварительно взвешенные пробирки Эппендорф, центрифугировали и взвешивали после отделения супернатанта. Средние значения трех взвешиваний умножали на объем колбы. Уровень деколоризации (*D*) красителя рассчитывали по оптической плотности супернатанта при длине волны 499 нм по формуле [34]. Результаты

сравнительных исследований накопления биомассы бактерий в присутствии разных концентраций красителей представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Вес биомассы бактерий *H.caseinilytica*33S7, выращенных в различных условиях

Краситель	Концентрация красителя, мг/л	Условие культивирования	Вес биомассы (мг) после культивирования в течение	
			М ± m 4 суток	7 суток
Кислотный хром темно-синий	50	С глюкозой	10,50 ± 0,14	15,35 ± 0,20
	50	Без глюкозы	10,30 ± 0,06	15,0 ± 0,25
Кислотный хром темно-синий	100	С глюкозой	10,22 ± 0,15	15,32 ± 0,23
	100	Без глюкозы	10,27 ± 0,08	15,15 ± 0,08
Амидо-черный Б	12,5	С глюкозой	9,58 ± 0,31*	14,87 ± 0,37*
	12,5	Без глюкозы	10,36 ± 0,14*	15,63 ± 0,24*
Амидо-черный Б	25	С глюкозой	9,98 ± 0,20	14,86 ± 0,18*
	25	Без глюкозы	10,12 ± 0,93	15,32 ± 0,14*

*Различия достоверны для уровня значимости $p < 0,05$

На основе полученных данных по наращиванию биомассы было выявлено, что при красителе кислотный хром темно-синий, при концентрации 50 мг/л и 100 мг/л наблюдается отсутствие влияния глюкозы на рост клеток, как на 4 сутки, так и на 7 сутки. При этом за трое суток биомасса нарастала в среднем на 50%. Значит, в качестве единственного источника углерода используется краситель.

При красителе амидо-черный 10Б, при концентрации 12,5 мг/л на 4 и 7 сутки выявлено влияние глюкозы на рост клеток. Однако, при концентрации 25 мг/л, на 4 сутки замечено отсутствие влияния глюкозы на рост биомассы. При этом, на 7 сутки, влияние глюкозы на рост клеток присутствует. На основе этого можно сделать вывод, что бактерии могли дольше приспосабливаться к

повышенной концентрации красителя и осваивать доступные питательные вещества.

Параллельно оценивали уровень деколоризации. Результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Уровень деколоризации красителей бактериями *H.caseinilytica* 33S7 при различных условиях и продолжительности культивирования

Краситель	Концентрация красителя (мг/л)/ с или без глюкозы	Уровень деколоризации (D) за время культивирования, сутки M±m	
		4 сут	7 сут
Кислотный хром темно-синий	50/ с глюкозой	48,60 ± 0,05*	69,23± 0,22*
	50 / без глюкозы	43,47±0,02*	75,50 ± 0,12*
Кислотный хром темно-синий	100 /с глюкозой	37,40 ± 0,01*	77,33± 0,12*
	100/без глюкозы	33,433±0,02*	79,26±0,02*
Амидо-черный 10Б	12,5/с глюкозой	43,833 ± 0,04*	44,366 ± 0,03*
	12,5/без глюкозы	46,0333±0,20*	46,4333±0,02*
Амидо-черный 10Б	25 /с глюкозой	33,13±0,05*	33,2 ± 0,01*
	25/ без глюкозы	34,53±0,01*	35,67 ± 0,125*

*Различия достоверны для уровня значимости $p < 0,05$

По полученным данным уровня деколоризации, для кислотного хрома темно-синего при концентрации 50 мг/л отсутствует достоверное влияние глюкозы на деколоризацию на 4 сутки эксперимента. Различия в уровне деколоризации связаны с нарастанием биомассы. Так, на 4 сутки достигается 48% деколоризации, а нарастание биомассы 10,5 мг, когда при 43% деколоризации нарастание биомассы равно 10,3 мг. С увеличением биомассы деколоризация продолжает идти за счет адсорбционных процессов.

При концентрации 100 мг/л кислотного хрома-темно синего уровень деколоризации снижен, как и снижен уровень нарастания биомассы, в отличии от результатов при концентрации в 50 мг/л. Это связано с тем, что культура дольше адаптируется к более высокой концентрации.

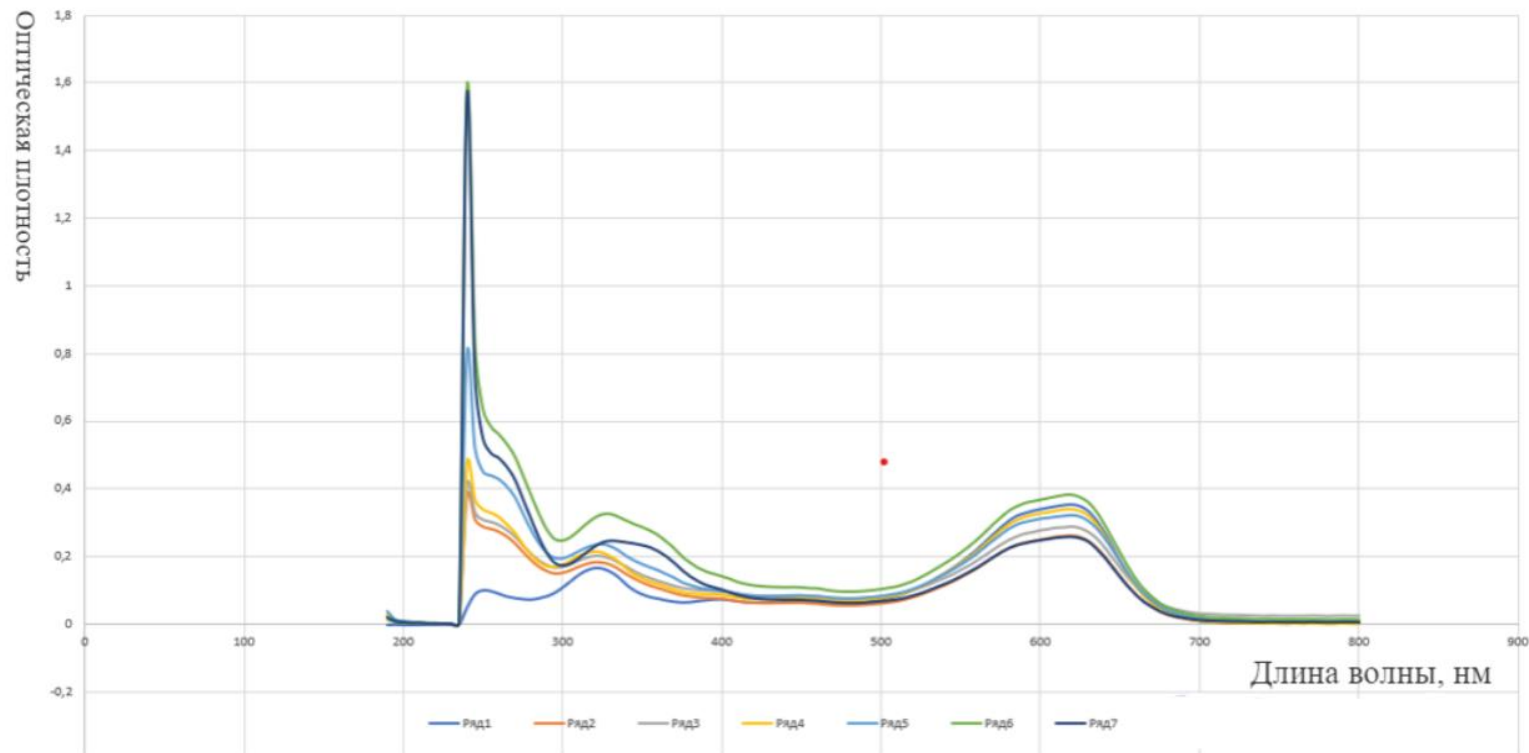
Это может быть объяснено тем, что при более высокой концентрации красителя микроорганизмы сталкиваются с более высоким уровнем стресса, что может замедлить их рост и размножение.

Постепенно культура микроорганизмов адаптируется к более высокой концентрации красителя и начинает проявлять более эффективные механизмы деколоризации и роста. Этот процесс требует большего времени, чем в случае с более низкой концентрацией красителя.

В случае с амидо-черным 10Б при обеих концентрациях к 4 суткам уровень деколоризации останавливается, к 7 суткам уровень практически не повышается. В таком случае можно предположить, что сочетаются дегенеративные процессы клеток, а также реализуется иной механизм биодеградации красителей. Так, вероятно, при нарастании культуры использовался адсорбционный процесс утилизации красителя, но при росте клеток и их гибели, краситель снова попадал в среду.

Так же был сделан спектрофотометрический анализ был проведен при двух концентрациях: 12,5 мг/л и 25 мг/л (см. рисунок 1), так как эти концентрации были выбраны для проведения эксперимента с целью изучения деградации азокрасителями до-черного 10Б бактериями *H. caseinilytica*. В

таблице 4 предоставлены данные о пиках на спектре и об изменениях в структуре вещества.



- «Ряд 1» - контрольный образец, конц. 12,5 мг/л
- «Ряд 2» - образец без глюкозы, рост 4 суток, конц. 25 мг/л
- «Ряд 3» - образец без глюкозы, рост 7 суток, конц. 12,5 мг/л
- «Ряд 4» - образец без глюкозы, рост 7 суток, конц. 25 мг/л
- «Ряд 5» - образец без глюкозы, рост 4 суток, конц. 12,5 мг/л
- «Ряд 6» - образец с глюкозой, рост 4 суток, конц. 25 мг/л
- «Ряд 7» - образец с глюкозой, рост 4 суток, конц. 12,5 мг/л

Рисунок 1 – Спектр поглощения амидо-черного-Б в области длин волн от 190 до 800 нм.

Заключение:

Выводы:

1. Бактерии *Halomonas caseinilytica* 33S7 имеют способность к биодegradации азокрасителей хромового темно-синего и амидо-черного 10Б. Лучший результат обнаружен при деколоризации хромового темно-синего (100 мг/л) за 7 суток и составил 79,3%, а при деколоризации амидо-черного 10Б (12,5 мг/л) за 4 суток – 46,7%. При этом красители использовались как единственный источник углерода.
2. Глюкоза оказывает незначительное влияние на деколоризацию красителей, что указывает на использование микроорганизмами красителей в качестве основного источника углерода.
3. Оптимальные условия для деколоризации красителей включают отсутствие углеводов, высокую концентрации солей, слабо - щелочную среду (рН 7-8), определенные концентрации красителей и оптимальные временные интервалы.

