

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

Кафедра биохимии и биофизики

**БИОДЕКОЛОРИЗАЦИЯ МАЛАХИТОВОГО ЗЕЛЕННОГО
ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ КЛЕТКАМИ
AZOSPIRILLUM BRASILENSE SR80**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студента 4-го курса 421 группы

Направления подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология

Биологического факультета

Коврижникова Александра Викторовича

Научный руководитель:

профессор, док. биол. наук



С.А. Коннова

Научный консультант:

в.н.с. ИБФРМ РАН, канд. биол. наук



М.А. Купряшина

Зав. кафедрой биохимии и биофизики,

профессор, док. биол. наук



С.А. Коннова

30.05.2022г.

Саратов 2022

Введение. Постоянно растущее население земли, развивающиеся медицина, сельское хозяйство, химические и энергетические отрасли промышленности, вкупе с индустриализацией обуславливают постоянный рост загрязнения окружающей среды. Для решения проблем очистки и восстановления нарушенных экосистем все более активно используются биологические методы, которые в большинстве случаев являются экономически обоснованной альтернативой химическим и физико-химическим методам. Приоритет отдается технологиям, основанным на использовании ферментативной активности микроорганизмов. Биопрепараты с иммобилизованными микроорганизмами-деструкторами, а также их ферментами, осуществляют эффективную биodeградацию как неорганических веществ, так и многих органополютантов.

Одна из больших и достаточно опасных групп загрязнителей – синтетические красители. Все синтетические красители являются производными бензола, т.е. ароматическими соединениями. Группу ферментов, способных активно окислять ароматические соединения, принято называть фенолоксидазами. Относительная специфичность этой группы ферментов позволяет принимать участие в реакциях, включающих аминоксифенолы, о- и п-дифенолы, ароматические амины, полифенолы и полиамины.

Показано, что почвенные ассоциативные diaзотрофы рода *Azospirillum* способны к биodeградации модельных препаратов лигнина и синтетических красителей, а также к продукции ферментов фенолоксидазного комплекса. Однако высокие концентрации загрязнителей оказывают ингибирующее действие на жизнеспособность азоспирилл, поэтому приемы иммобилизации могут способствовать интенсификации биотехнологического потенциала азоспирилл.

В связи с вышеизложенным, целью настоящей работы было выявление эффективности деколоризации малахитового зеленого иммобилизованными в альгинатный гидрогель клетками *A. brasilense* SR80.

Для реализации поставленной цели решались следующие задачи:

1. Получить иммобилизованные в Са-альгинатные шарики клетки *A. brasilense* SR80, проанализировать уровень их метаболической активности.
2. Оценить эффективность биодеколоризации малахитового зеленого в различных условиях иммобилизованными клетками азоспирилл.
3. Определить возможность повторного использования иммобилизованных клеток *A. brasilense* SR80 для обесцвечивания малахитового зеленого.

Структура и объем работы. Бакалаврская работа состоит из введения, 3 глав (обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследований и их обсуждение), заключения, выводов, списка используемой литературы. Список литературы включает 92 источника на русском и английском языках. Работа изложена на 54 страницах машинописного текста.

Основное содержание работы. В обзоре литературы бакалаврской работы описаны особенности биодеколоризации синтетических красителей, опасность красителя малахитового зеленого, биология, экология и таксономия бактерий рода *Azospirillum*, а также способность азоспирилл к деколоризации синтетических красителей. В разделе, посвященном материалам и методам исследования, представлена информация об объектах исследования и методах, использованных в ходе выполнения экспериментов.

Объектом исследования был штамм: *A. brasilense* SR80, полученный из Коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН. Бактерии культивировали на жидкой малатно-солевой среде следующего состава [г/л]: K_2HPO_4 – 0,1; K_2HPO_4 – 0,4; NaCl – 0,1; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,002, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,02; яблочная кислота – 5; NaOH – 1,7; NH_4Cl – 1; CaCl_2 – 0,02; pH 6,8. Среду стерилизовали в течение 30 мин при 121°C. Посевным материалом служила 12-часовая культура, выращенная на среде того же состава. Бактерии для исследования культивировали в термостате при температуре 37°C.

2-ух суточную бактериальную культуру осаждали центрифугированием. 1 г бактериальных клеток суспензировали в 5 мл фосфатно-солевого буфера и смешивали с 50 мл стерильного раствора 1%, 2,5%, 5 % (в зависимости от эксперимента) альгината натрия. Затем суспензию перемешивали в течение 30 мин при комнатной температуре. Для формирования Са-альгинатных шариков добавляли получившуюся суспензию к 0,2 М хлориду кальция (CaCl_2) по каплям, с использованием перистальтического насоса, с расстояния 20 см от поверхности раздела фаз через стерильный шприц. Полученные шарики дважды отмывали в чистом растворе 0,2 М CaCl_2 , и хранили при 4 °С.

Для выявления жизнеспособных клеток, носители с иммобилизованными азоспириллами раскладывали на поверхность агаризованной малатно-солевой среды в чашках Петри. Через 4-6 суток культивирования регистрировали бактериальный рост.

Также жизнеспособность бактериальных клеток, иммобилизованных на различных носителях, оценивали стандартным резаурин-тестом с незначительными модификациями. Для построения калибровочной кривой в лунках 96-луночного планшета делали серию двойных разведений суспензии бактерий в фосфатно-солевом буфере, начиная с $\text{OP}_{600}=0,5$, объемом по 50 мкл. Затем в лунки добавляли 100 мкл рабочего раствора AlamarBlue с концентрацией 0,01 г/л, приготовленного на фосфатном буфере. Образцы инкубировали при температуре 28°C в течение 24 ч. Мониторинг дыхательной активности иммобилизованных бактерий проводили в 24-луночных культуральных полистироловых планшетах, для этого в отдельные лунки вносили по 1 и 2 мг носителей с бактериями (опытные образцы) и без бактерий (отрицательный контроль). Затем в лунки добавляли по 500 мкл рабочего раствора AlamarBlue. Образцы инкубировали при температуре 28°C в течение 24 ч, затем отбирали для флуориметрического анализа по 100 мкл жидкости в отдельные лунки 96-луночного планшета. Измерения проводили на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Agilent, США) при следующих параметрах: длина волны возбуждения – 530 нм, длина волны эмиссии – 600 нм, ширина

щели – 10 нм, время интегрирования – среднее. Значения интенсивности флуоресценции экспериментальных и контрольных образцов нормировались на бланк (раствор резазурина в фосфатно-солевом буфере).

Количественный учет клеток до и после контакта с альгинатным гелем осуществляли путем посева опытных образцов на твердую малатно-солевую среду, используя метод серийных разведений. Количество выросших колоний выражали общим числом колониеобразующих единиц (КОЕ).

Степень инкапсуляции бактериальных клеток в гранулах вычисляли по формуле:

$$A (\%) = (m_1 / (m_2 + m_3)) \times 100 \%,$$

где A – степень инкапсуляции, %; m_1 – масса альгинатных шариков после иммобилизации; m_2 – масса бактериальных клеток, использованных при иммобилизации, m_3 – масса альгината.

Исследования поверхностной морфологии носителей, иммобилизованных на них бактерий, а также отдельных бактериальных клеток, осуществляли методом СЭМ на базе Научно-образовательного центра по направлению «Нанотехнологии» СГУ имени Н.Г. Чернышевского с использованием растрового электронного микроскопа (ЭМ) высокого разрешения Mira\LMU («Tescan», Чехия).

Исследование способности иммобилизованных в Са-альгинатные шарики клеток азоспирилл к деколоризации синтетических красителей исследовали в отношении малахитового зеленого («Вектон», Россия).

Степень обесцвечивания анализировали спектрофотометрически на планшетном фотометре Spark-10M («Tescan», Швейцария) при длине волны 600 нм. Измерение проводили в 96-луночных полистироловых планшетах («МиниМед», Россия).

Степень деколоризации красителя выражали в процентах и рассчитывали по формуле:

$$\%_{\text{деградации}} = 100 \times \frac{A_{\text{начальное}} - A_{\text{конечное}}}{A_{\text{начальное}}}$$

где $A_{\text{начальное}}$ – начальное поглощение, а $A_{\text{конечное}}$ – конечное поглощение красителя после культивирования.

В условиях эксперимента культивирование проводилось на малатно-солевой среде при внесении красителей в конечной концентрации 0,01 мМ, 0,1 мМ, 0,5 мМ, 1 мМ.

Эффективность деколоризации малахитового зеленого иммобилизованным клетками оценивали при инкубации в малатно-солевой среде, картофельном отваре, фосфатно-солевом буфере, стерильной водопроводной воде, в условиях стационарного культивирования, и аэрации при выращивании на качалке.

Ферментативную активность детектировали спектрофотометрически. Фенолоксидазную активность определяли по скорости окисления 2,6-диметоксифенола при длине волны 468 нм ($\epsilon=30,5 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). За единицу активности принимали количество фермента, катализирующего превращение 1 μM субстрата за 1 мин. Удельную активность выражали в единицах на 1 мг белка. О содержании белка судили по количественной реакции с реактивом Бредфорд.

Анализ степени инкапсуляции бактериальных клеток в гранулах показал, что использование 5% альгината в качестве матрицы приводит к получению выхода иммобилизованных клеток более 80%. При этом размер образовавшихся пор в структуре шариков не приводит к естественному «вымыванию» клеток из альгинатного геля, что подтверждается данными подсчета КОЕ элюата. Данные анализа представлены в таблице 1.

Таблица 1. Характеристика Са-альгинатных шариков с иммобилизованными азоспириллами

| Концентрация альгината, % | Размер шариков, мм | Степень инкапсуляции, % | КОЕ, кл./шарик |
|---------------------------|--------------------|-------------------------|------------------------------|
| 5 | 2-3 | 82,19±1,7 | $(3 \pm 0,4) \times 10^7$ |
| 2,5 | 2-4 | 66,12±0,4 | $(0,8 \pm 0,1) \times 10^7$ |
| 1 | 3-4 | 59,09±0,4 | $(0,1 \pm 0,05) \times 10^7$ |

В качестве оценочного метода был применен общепринятый резазурин-тест. Представленная на рисунке 1 калибровочная кривая с линейной зависимостью между оптической плотностью (количеством клеток) и их дыхательной активностью, наглядно демонстрирует адекватность резазурин-теста в условиях наших экспериментов. Результаты измерения респираторной активности опытных образцов (иммобилизованных клеток), представленные на рисунке 2, свидетельствуют о наличии жизнеспособных клеток в альгинатных шариках.

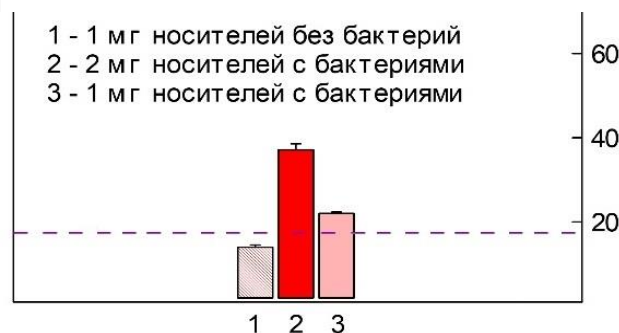
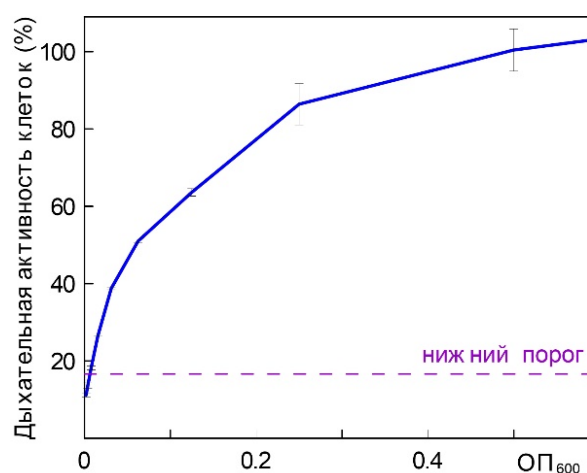


Рисунок 1 – Калибровочная кривая линейной зависимости оптической плотности и дыхательной активности иммобилизованных бактерий

Рисунок 2 – Дыхательная активность носителей с бактериями и без них

По данным СЭМ Са-альгинатные шарики обладали сферической формой, имели компактную внешнюю структуру с относительно гладкой поверхностью без явных повреждений матрицы, диаметр гранул составлял около 1 мм (после дегидратации). На поверхности иммобилизованных шариков визуализировались поры, отмечалось отсутствие бактериальных клеток.

Полученные иммобилизованные клетки инкубировали в присутствии малахитового зеленого в конечной концентрации 1 мМ и 0,1 мМ в течение 9 дней. Контрольные образцы содержали интактные Са-альгинатные шарики. Оценивали воздействие концентрация красителя и концентрация альгината, а также инкубационной среды на обесцвечивание малахитового зеленого

иммобилизованными клетками *A. brasilense* SR80. Для исследования процесса интенсификации ферментативной активности бактерий, отбирали пробы для определения пероксидазной активности по скорости окисления 2,6-диметоксифенола.

Иммобилизованные клетки оказались способны к деколоризации 0,1 мМ малахитового зеленого при использовании матрицы во всех анализируемых концентрациях, что представлено на рисунке 5.

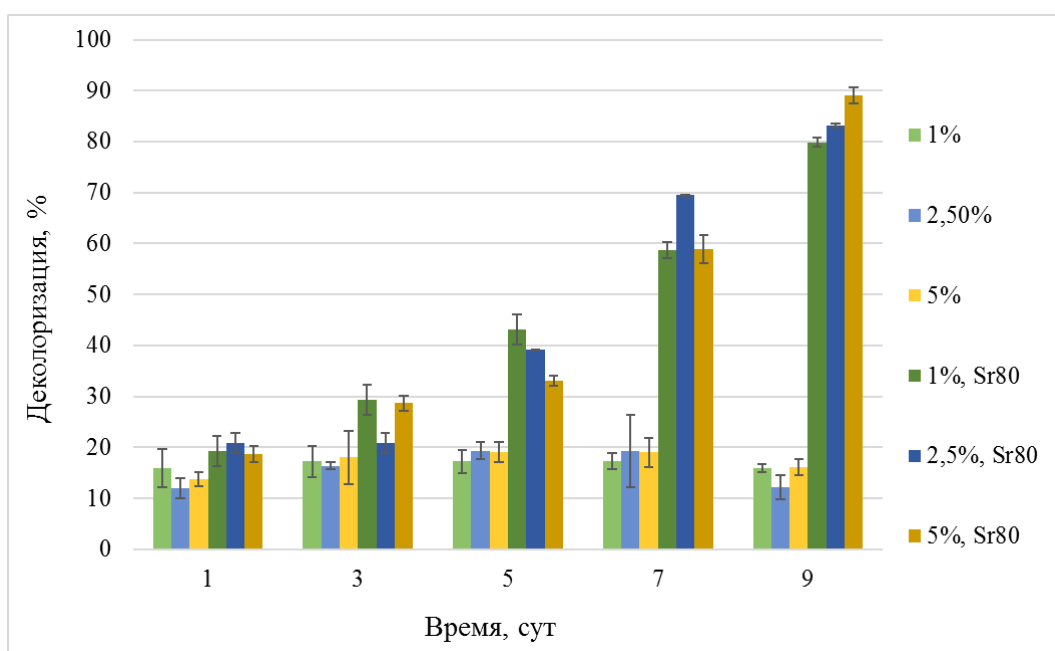


Рисунок 3 – Деколоризация в малатно-солевой среде 0,1 мМ малахитового зеленого иммобилизованными в Са-альгинатный гидрогель (альгинат 1, 2,5, 5 %) азоспириллами.

Иммобилизованные клетки оказались способны к деколоризации 0,1 мМ малахитового зеленого при использовании матрицы во всех анализируемых концентрациях.

Степень деколоризации иммобилизованными клетками 50% достигалась после 5-7 суток инкубации, в то время как свободные клетки обесцвечивали 0,1 мМ раствор малахитового зеленого с аналогичной эффективностью уже на 2 сутки. Более низкая скорость обесцвечивания для иммобилизованных клеток вероятнее всего обусловлена ограниченностью среды, возникающей из-за плотного включения бактерий в структуру

гидрогеля. При проведении эксперимента степень деколоризации красителя увеличивалась почти линейно до полного обесцвечивания.

В первые сутки нами отмечалось резкое падение концентрации красителя от 5 до 15% по сравнению с контролем, связанное с адсорбционной способностью самого альгината. Дальнейшие изменения в интенсивности обесцвечивания, отмечались начиная с 4-х суток инкубации. С увеличением времени инкубации метаболическая активность иммобилизованных клеток возрастала, и не снижалась даже спустя 10 суток термостатирования. Это указывает на то, что альгинат кальция, используемый в качестве матрицы в данном биореакторе, обеспечивает высокую стабильность энзиматической активности. Самые высокие значения степени деколоризации были получены при внесении в качестве матрицы 5% альгината.

При использовании суспензионных культур в реакциях обесцвечивания, было отмечено, что краситель уже в концентрации 0,1 мМ снижает рост и развитие бактерий, что обусловлено токсическим действием данного соединения. Известно, что реакционноспособные группы сульфоновой кислоты (SO_3H) на ароматических кольцах синтетических красителей значительно ингибируют рост микроорганизмов. Однако применение иммобилизованных клеток позволило добиться обесцвечивания высоких концентраций красителя. Степень деколоризации 1 мМ раствора малахитового зеленого не достигала 50% даже после 7 дней инкубации, однако на 9 сутки отмечалось визуальное обесцвечивание раствора, соответствующее эффективности более 60%. Эффективность деколоризации положительно коррелировала с увеличением ферментативной активности.

Далее мы проанализировали обесцвечивание малахитового зеленого с использованием иммобилизованных клеток в таких инкубационных средах как фосфатно-солевой буфер (рН 6,8), картофельный отвар и водопроводная вода. В фосфатно-солевом буфере детектировалось разрушение Са-альгинатных шариков и высвобождение клеток спустя сутки термостатирования. Высокая степень деколоризации красителя отмечалась

при использовании картофельного отвара, порог в 50% обесцвечивания иммобилизованные клетки преодолевали уже на 3 сутки инкубации. Однако не смотря на высокую интенсификацию деколоризации и стимуляцию ферментативной активности полного обесцвечивания раствора не происходило. Перспективными представляются данные о возможности использования азоспирилл иммобилизованных в альгинатный гидрогель для деколоризации малахитового зеленого в водопроводной воде, степень обесцвечивания красителя через 7 суток инкубации составила 60%.

На следующем этапе исследования нами были проведены многократные серийные эксперименты для проверки возможности повторного использования иммобилизованных в Са-альгинатный гель клеток штамма *A. brasilense* SR80 для деколоризации малахитового зеленого (рисунок 4).

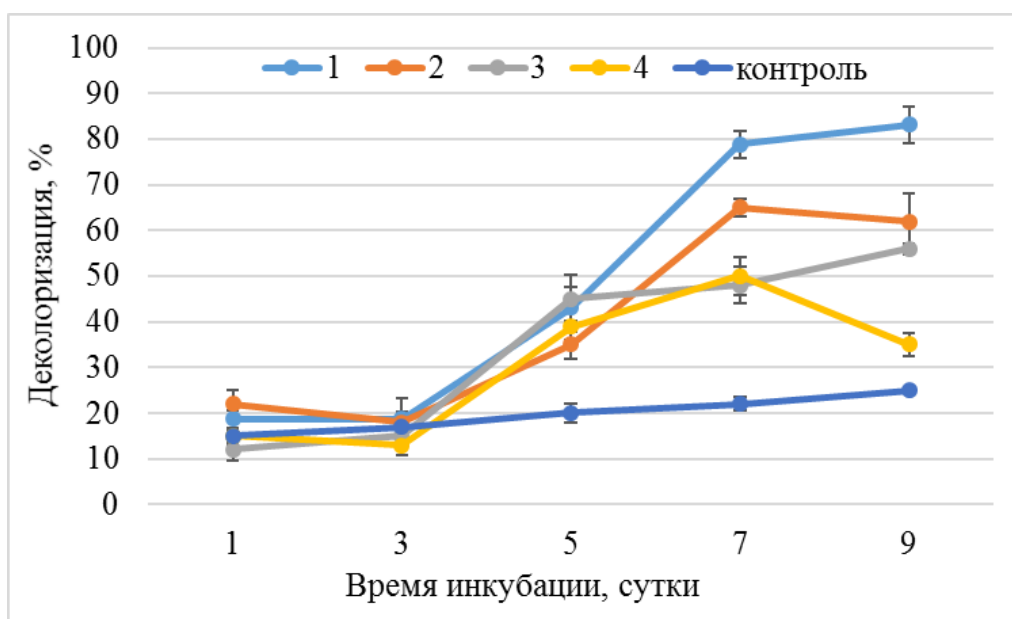


Рисунок 7 – Деколоризация в малаочно-солевой среде 0,5 мМ малахитового зеленого иммобилизованными в Са-альгинатный гидрогель азоспириллами в течение 4-х циклов (1 – первый цикл, 2 – второй цикл, 3 – третий цикл, 4 – четвертый цикл)

Контролем выступали интактные Са-альгинатные шарики. Проведение повторных циклов обесцвечивания (10 дней инкубации с последующей отмывкой Са-альгинатных шариков в фосфатно-солевом буфере) показало возможность повторного использования иммобилизованных клеток для биодеколоризации малахитового зеленого. Иммобилизованные клетки

непрерывно обесцвечивал малахитовый зеленый после 4-х повторных циклов без значительной потери активности (снижение на 13, 19, 31% от их первоначальной активности, соответственно). Однако не смотря на высокие показатели степени биодеколоризации в наших экспериментах происходило разрушение матрицы. Как было отмечено ранее, матрица, используемая при иммобилизации бактерий для успешной интенсификации биотехнологических процессов, должна представлять систему открытых пор, обеспечивающих хорошие условия для обмена метаболитами между клеткой и окружающей средой. К сожалению, частицы носителя, полученные с учетом этих требований, обладают низкой прочностью. Мы столкнулись с тем, что не смотря на сохранение препаратами высокой степени деколоризации и метаболической активности, после 4 цикла структура Са-альгинатных гранул физически разрушилась.

Выводы:

1. С использованием метода «мягкой» иммобилизации, основанном на физическом связывании, получены инкапсулированные в альгинатный гидрогель клетки *A. brasilense* SR80. Показано, что клетки сохраняют дыхательную активность и способность к росту во время иммобилизации, что подтверждает перспективность использования альгината в качестве матрицы для инкапсуляции азоспирилл.
2. Эффективность биодеколоризации малахитового зеленого в различных условиях иммобилизованными клетками азоспирилл варьировалась от 50% до 90% на 9 сутки инкубации.
3. Повторное использование иммобилизованных клеток *A. brasilense* SR80 для обесцвечивания малахитового зеленого возможно до четырех раз, после чего наблюдается разрушение матрицы носителя.

