

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

Кафедра биохимии и биофизики

**ВЫЯВЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ БАКТЕРИЙ *BACILLUS SUBTILIS*
EGP5QL12 ПО ДЕКОЛОРИЗАЦИИ ДИАЗОКРАСИТЕЛЕЙ**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

студентки 4 курса 421 группы

Направления подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология

Биологического факультета

Чиркиной Марии Николаевны

Научный руководитель:

профессор кафедры биохимии и биофизики,

док. биол. наук, профессор:

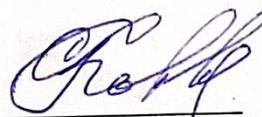


С.А. Коннова

30.05.2025

Зав. кафедрой биохимии и биофизики,

док. биол. наук, профессор:



С.А. Коннова

30.05.2025

Саратов 2025

Введение. Синтетические красители представляют собой обширную группу химических соединений, находящихся широкое применение в различных областях человеческой деятельности. Они используются в производстве лаков, красок, а также в косметической, текстильной, пищевой и фармацевтической отраслях. Большую долю среди них составляют азокрасители.

В связи с быстрым развитием индустриализации, постоянно увеличивается количество производимых красителей. При использовании технологий, связанных с красящими веществами, часто образуются отходы, содержащие остатки красителей. Эти синтетические соединения могут затем попадать в сточные воды. В основном красители являются трудноразлагаемыми и токсичными веществами, что может навредить как окружающей среде, так и живым существам. Попадая в водоемы, красители могут отрицательно влиять на способность к самоочищению, на уровень кислорода в воде, на проникновение солнечного света и т. д. Возрастающее количество красящих веществ, попадающих во внешнюю среду, является большой угрозой, поэтому поиск методов их разрушения на сегодняшний день особенно актуален.

Было создано множество различных способов борьбы с проблемой загрязнения красителями. В основном методы очистки делят на физические и химические, также они могут быть в различных комбинациях. Другой большой группой является биологические методы очистки. Они имеют ряд преимуществ, так как требуют меньше денежных расходов и ресурсов, считаются более экологичными. В этом способе очистки принимают участие микроорганизмы, в основном бактериальные клетки. Их высокая метаболическая активность позволяет разрушать азокрасители. Однако далеко не все могут быть задействованы как разлагающие агенты в связи с неблагоприятными условиями среды. Галофильные и галотолерантные микроорганизмы благополучно справляются с этой проблемой, им не мешают экстремальные условия окружающей среды, поскольку эти бактерии приспособлены к жизни с высокой концентрацией солей, что часто свойственно сточным водам. В последнее время

множество исследований посвящено изучению разрушения красителей с помощью бактерий, которые могут осуществлять ферментативную деструкцию различных красителей.

Цель настоящей работы состояла в выявлении активности бактерий *Bacillus subtilis* EGP5QL12 по деколоризации азокрасителя кислотный хромовый темно-синий.

Для реализации поставленной цели решались следующие задачи:

1. Выявить способность бактерий *B. subtilis* EGP5QL12 к деколоризации красителя хромовый темно-синий в экспериментах при выращивании на твердых и жидких питательных средах.

2. Определить характер влияния аэрации, дополнительных источников углерода на интенсивность деколоризации азокрасителя – хромового темно-синего.

3. Изучить изменения в структуре кислотного хрома темно-синего при его обесцвечивании бактериями *B. subtilis* EGP5QL12 с помощью ИК-спектроскопии.

Объектом исследования являлись галофильные бактерии *Bacillus subtilis* EGP5QL12, любезно предоставленные сотрудниками Лаборатории биохимии Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов (ИБФРМ РАН).

Культура *B. subtilis* EGP5QL12 была выделена из образцов озера Карун (Египет).

Для поддержания жизни культуры использовали агаризованную среду ГРМ следующего состава сухих компонентов из расчета г/л: панкреатический гидролизат рыбной муки (ПГРМ) – 12, пептон сухой ферментативный – 12, микробиологический агар – 10 ± 2 , с добавлением 5% NaCl.

Среду стерилизовали в течение часа при 120°C, затем разливали на чашки Петри. Культуру выращивали 24 часа в термостате при температуре 35°C, затем использовали в качестве посевного материала.

Исследуемые азокрасители – кислотный хром темно-синий и метиловый оранжевый.

Для выявления способности бактерий к деколоризации азокрасителей выполняли эксперимент на чашках Петри со средой Бушнелла-Хааса

Для опыта использовался 2% раствор сахарозы, стерилизованный при 0,5 атм в течение 30 минут. Готовая среда была разделена на отдельные стерильные колбы, в некоторые колбы добавлялся стерильный раствор 2% сахарозы, в других сахароза отсутствовала. Также распределялись растворы красителей метиловый оранжевый и кислотный хром темно-синий. Содержимое колб распределялось на чашки, разделенные на 3 сектора, в одном из которых были вырезаны лунки. Бактерии выращивали 2 суток при температуре 35°C на среде LB следующего состава: пептон – 10 г/л; дрожжевой экстракт – 5 г/л; NaCl – 50 г/л. После центрифугирования культуральной жидкости и подготовки инокулята, бактерии вносили в лунки и на остальные секторы. Инкубировали чашки в термостате при 35°C в течение 7 суток, после чего фиксировали появление зон просветления красителя вокруг колоний на первом секторе, образование колоний бактерий на втором и третьем секторах.

Для определения количественного потенциала деградации красителей микроорганизмы культивировали в минеральной среде Бушнелла-Хааса с добавлением только кислотного хромового темно-синего в диапазоне концентраций 25-150 мг/л, так и с дополнительными источниками углерода: сахарозы или глюкозы (конц. 1%). Инкубацию проводили при температуре 35°C на орбитальном шейкере при 140 об/мин в течение 7 сут. Контроль деколоризации выполняли колориметрическим методом по оптической плотности культуральной жидкости при длине волны 540 нм на фотоэлектроколориметре.

Кроме того, во всех экспериментах контролировали накопление биомассы, чтобы выявить способность бактериальной культуры использовать краситель как источник углерода, а также оценить ингибирующий эффект КХТС при выращивании с добавлением углеводов. Полученные данные подвергались статистической обработке.

Также для анализа биodeградационного процесса были проведены исследования методом ИК-спектроскопии на приборе Nicolet 6700 (Thermo Scientific). Были выбраны концентрации красителя кислотного хрома темно-синего 25 и 50 мг/л, в опыте использовали растворы сахарозы и глюкозы 1%, в отдельных образцах дополнительный источник углерода не добавляли. Добавлялись как живые бактерии, так и мертвые.

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 источника на русском и английском языках. Работа изложена на 50 страницах машинописного текста. Работа проиллюстрирована 17 рисунками и 3 таблицами.

Основное содержание работы. Предварительный эксперимент по выявлению способности бактерий использовать красители в трофических целях для бактериальной культуры, провели на твердой питательной среде. Добавление сахарозы или глюкозы в качестве источника углерода необходимо, в связи с тем, что многие красители имеют сложную структуру и являются труднорастворимыми, дополнительный источник углерода стимулирует рост бактерий и их размножение. На чашках Петри в среде с добавлением сахарозы, как дополнительного источника углерода, наблюдался интенсивный рост колоний во всех 3 секторах. Обильнее всего рост культуры происходил при посеве бактерий из жидкой питательной среды LB. В среде без добавления сахарозы рост бактерий был скудным, образовалось небольшое количество мелких колоний. Однако это свидетельствует о том, что бактерии могут развиваться в присутствии токсичных азокрасителей кислотный хром темно-синий и метиловый оранжевый. Также вокруг лунок, с внесенными клетками, на чашке с добавлением красителя кислотный хромовый темно-синий наблюдалась зона обесцвечивания красителя диаметром 0,5-1 мм, это означает, что бактерии способны разрушать азокрасители, синтезируя ферменты, расщепляющие азосоединения.

На рисунке 1 отражено влияние концентрации красителя на процент деколоризации.

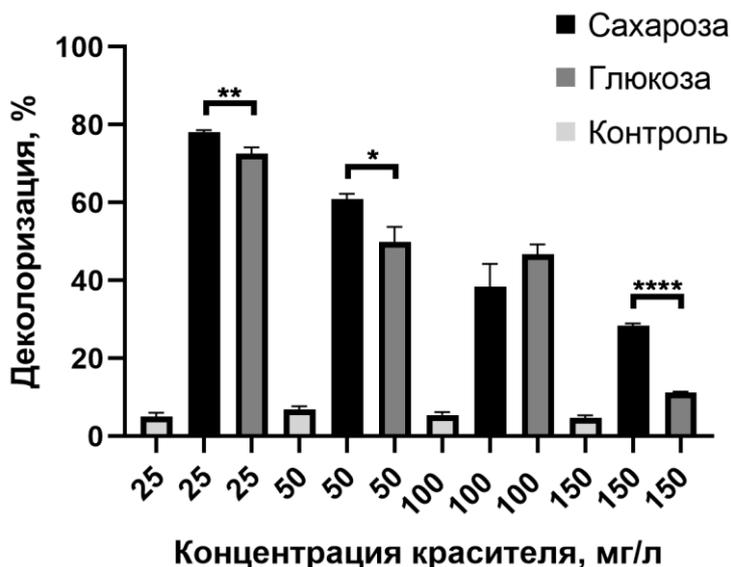


Рисунок 1 – Влияние дополнительных источников углерода и концентраций красителя кислотный хром темно-синий в среде Бушнелла-Хаасана на уровень деколоризации. *Различия достоверны для уровня значимости $p < 0,05$.

Выращивание бактерий на минеральной среде без дополнительных источников углерода поддерживало слабый рост бактерий и низкий уровень деколоризации – менее 7% за 7 суток роста. Несмотря на слабую деколоризацию культура способна была выживать в условиях токсического воздействия красителя и недостатке источника углерода, что говорит о ее стрессоустойчивости.

Добавление дополнительного источника углерода - сахарозы или глюкозы к КХТС в концентрации 25 мг/л положительно влияло на накопление биомассы и процент деколоризации был максимальным $78,10 \pm 0,51\%$ и $72,63 \pm 1,58\%$ соответственно. Сам факт накопления биомассы в данных условиях косвенно свидетельствует о том, что продукты деградации красителя являются мало токсичными для бактерий. Показано также, что наращиванию биомассы и деколоризации способствовала аэрация культуры, которая более длительный период позволяла поддерживать планктонную форму существования популяции

бактерий, в то время как снижение интенсивности аэрации приводило к образованию менее активных в деколоризации биопленок.

Как видно из рисунка, повышение концентрации КХТС в среде приводило к снижению уровня деколоризации, и при концентрации красителя 150 мг/л процент деколоризации имеет наименьшие значения, несмотря на присутствие углеводов, что указывает на превышение порога токсичности КХТС для данного штамма.

Был проведен анализ образцов культуральной жидкости и красителя кислотный хром темно-синий методом инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье.

Пик вблизи волнового числа 1540 см^{-1} средней интенсивности может соответствовать нескольким группам: валентные колебания $\text{C}=\text{C}$ в ароматических кольцах или колебания $-\text{N}=\text{N}-$ азогруппы, которые часто проявляются в этом диапазоне. Сильный пик на 1352 см^{-1} соответствует валентным колебаниям $\text{S}=\text{O}$ сульфогрупп, характерных для кислотных красителей. Симметричные и асимметричные колебания $\text{S}=\text{O}$ обычно дают сильные пики в диапазоне $1300\text{-}1370 \text{ см}^{-1}$. Это подтверждает наличие сульфогруппы, типичной для кислотного хром тёмно-синего.

Пик вблизи 1098 см^{-1} средней интенсивности может быть связан с колебаниями $\text{C}-\text{N}$ связей. Волновое число 948 см^{-1} находится в области деформационных колебаний $\text{C}-\text{H}$ ароматических колец.

На рисунке 1.2 изображен результат ИК-спектроскопии образца, в котором инкубировались бактерии в присутствии сахарозы. Широкий пик на 3341 см^{-1} указывает на валентные колебания $\text{O}-\text{H}$ или $\text{N}-\text{H}$, связанные с образованием спиртов, фенолов или аминов из-за разрыва азосвязи бактериями. Пики на 2938 и 2898 см^{-1} соответствуют $\text{C}-\text{H}$ колебаниям в алифатических группах (CH_2 , CH_3), указывая на деградацию ароматической структуры. Пик на 1641 см^{-1} отражает образование аминов при деколоризации. Пики на 1412 , 1353 , 1250 см^{-1} связаны с деформационными колебаниями $\text{C}-\text{H}$, $\text{C}-\text{N}$ или $\text{C}-\text{O}$ в аминах, эфирах или фенолах. Пик на 1055 см^{-1} указывает на $\text{C}-\text{O}$ колебания спиртов, эфиров или

аминов, а пики на 925, 867, 820 см^{-1} — на деформации С-Н ароматических связей.

Спектр подтверждает бактериальную деградацию красителя с разрывом азосвязи, образованием аминов, спиртов, фенолов и алифатических фрагментов, а также сохранением ароматических структур. Аналогичные изменения наблюдались в образце с концентрацией азокрасителя 50 мг/л при добавлении глюкозы и инкубации с бактериями. Это может быть связано с тем, что обе концентрации красителя позволяют бактериям эффективно его метаболизировать без токсического воздействия.

Также были исследованы образцы с добавлением инактивированных бактерий, сравнение которых с контрольным образцом представлено на рисунке 2. Результаты ИК-спектроскопии показали отсутствие значительных различий между контрольным образцом и образцом с мёртвыми клетками. Тем не менее, в спектрах образцов 3 и 4 отмечено появление слабовыраженных пиков на 3854 см^{-1} и 3745 см^{-1} , которые обычно соответствуют валентным колебаниям гидроксильных групп.

Это означает, что погибшие клетки не способны осуществлять процесс биodeградации азокрасителей с помощью ферментов. Однако изменения в ИК-спектрах могут указывать на частичную адсорбцию красителя клетками бактерий.

Не было обнаружено значительных изменений в ИК-спектрах между свежеприготовленными образцами и инкубированными в течение 7 суток без бактерий с добавлением красителя в концентрациях 25 и 50 мг/л.

На основе полученных данных можно сделать вывод, что появление значительных различий в ИК- спектрах образцов с бактериями и источником углерода в качестве сахарозы или глюкозы, подтверждает протекание процесса биodeградации КХТС бактериями *B. subtilis* EGP5QL12. Пики ИК-спектра образца с бактериями указывают на разрушение азосвязи и ароматических колец с образованием более простых молекул (амины, спирты, и др.).

Заключение: В последние годы бактерии *B. subtilis* широко используются для оценки их способности обесцвечивать красители. Выделяются новые штаммы, которые способны к высокому потенциалу биodeградации. Например, штамм *B. subtilis*, выделенный из отходов текстильной промышленности Тируппура, эффективно разлагает красители, такие как реактивный синий 160, красный 11, зеленый 16, фиолетовый 131, серый 22 и другие, достигая 100% обесцвечивания при концентрациях 300 и 500 мг/л за 48 часов. Другой штамм *B. subtilis* обесцвечивает азокраситель green-PLS на 99,05% и способен разлагать orange 2.

В проведенных нами исследованиях показано, что культура *B. subtilis* EGP5QL12 проявляет способность к биodeградации азокрасителей, таких как кислотный хромовый и метиловый оранжевый. Оптимальные условия для достижения обесцвечивания красителей включают наличие дополнительного источника углерода, высокую концентрацию солей, нейтральную или слабощелочную среду и определенные диапазоны концентраций красителей. Также процессу биodeградации способствует аэрация культуры, которая обеспечивает поступление кислорода, необходимого для метаболической активности бактерий и окисления красителей, ускоряя их разложение, предотвращает образование менее эффективных в биodeградации биопленок.

Процесс обесцвечивания азокрасителей может свидетельствовать о том, что микроорганизмы используют сами красители в качестве источника углерода, однако для более показательного результата необходимо добавление дополнительного источника углерода, например, сахарозы или глюкозы для стимуляции роста бактерий.

Биodeградацию азокрасителей можно выявить по изменениям в ИК-спектрах, где исчезновение исходных пиков и появление новых указывает на разрушение молекулы красителя и образование новых химических соединений.

Изучение процесса деколоризации азокрасителей с помощью бактерий представляет собой перспективное направление научных исследований и имеет большое значение для экологии. Это открывает новые возможности для

разработки эффективных и экологически безопасных методов очистки сточных вод и утилизации красителей, что способствует снижению уровня загрязнения окружающей среды.

Выводы: 1. Показано, что бактерии *B. subtilis* EGP5QL12 способны деколоризировать краситель кислотный хромовый темно-синий в экспериментах при культивировании на твёрдых и жидких питательных средах.

2. Сахароза и глюкоза оказывают положительное влияние на рост бактерий в присутствии азоокрасителей. Лучшие результаты деколоризации достигнуты при выращивании бактерий на орбитальном шейкере в жидкой среде Бушнелла-Хааса с добавлением красителя кислотного хрома темно-синего в концентрации 25 мг/л: в присутствии сахарозы – $78,10 \pm 0,51\%$, в присутствии глюкозы – $72,63 \pm 1,58\%$.

3. Установлено методом ИК-спектроскопия с преобразованием Фурье, что деколоризация азоокрасителя кислотного хромового тёмно-синего обусловлена значительными структурными изменениями, выявленными при сравнении контрольного образца (без бактерий) с образцом, инкубированным с бактериями в присутствии сахарозы или глюкозы. В последнем наблюдался широкий пик (3341 см^{-1}), соответствующий колебаниям O-H или N-H, что указывает на образование спиртов, фенолов или аминов в результате бактериального разрушения азосвязи.

