

УДК 579.66

А. С. САМСОНОВА

## ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ГЛУБИННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ-ДЕСТРУКТОРОВ ЖИРОВЫХ ВЕЩЕСТВ

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, e-mail: samsonova@mbio.bas-net.by

(Поступила в редакцию 05.05.2014)

**Введение.** Биологическая очистка сточных вод основана на способности микроорганизмов использовать в качестве питательных веществ многие органические и неорганические соединения, содержащиеся в сточных водах [1, 2]. Однако сточные воды, содержащие технические и пищевые масла в высоких концентрациях, являются проблемными для биологической очистки с помощью активного ила. Для обработки таких сточных вод в последние годы все активнее предлагаются способы, основанные на использовании активных штаммов бактерий-деструкторов жиров и масел [3, 4]. При микробной деструкции жировые вещества распадаются до глицерина и высших жирных кислот, которые включаются в цикл трикарбоновых кислот и образуют конечные безвредные продукты распада: углекислый газ и воду. В связи с этим поиск в природе наиболее активных микроорганизмов-деструкторов и разработка на их основе препаратов для очистки сточных вод и других сред от жировых веществ – задача актуальная как с экономической, так и экологической точки зрения.

Одним из необходимых условий создания микробных препаратов является успешный подбор питательной среды и разработка условий культивирования микроорганизмов, составляющих данный препарат.

Цель настоящего исследования – оптимизация условий глубинного культивирования микроорганизмов-деструкторов жировых веществ.

**Объекты и методы исследования.** Объектами исследования служили активные штаммы микроорганизмов-деструкторов жировых веществ *Rhodococcus sp.* P1–3ФН, *Rhodococcus ruber* 2В, *Bacillus subtilis* 6/2-АПФ1, *Pseudomonas putida* 10АП, отобранные в коллекции непатогенных микроорганизмов лаборатории деградации ксенобиотиков и биоремедиации природных и производственных сред Института микробиологии НАН Беларуси; сточная вода биологических очистных сооружений (БОС) УП «Копыльское ЖКХ».

Предварительное выявление липолитической активности отобранных микроорганизмов осуществляли на агаризованном 0,2 М фосфатном буфере (рН 7,4, агар 2 %). В качестве индикатора использовали метиловый красный (0,01 %), а твин-80 (2 %) – в качестве субстрата. Об активности судили по величине зоны гидролиза вокруг бактериальных колоний [5].

Определение активности липазы осуществляли модифицированным методом Ота, Ямада, основанном на определении путем титрования щелочью жирных кислот, образовавшихся под действием липазы при использовании в качестве субстрата оливкового масла [6].

Определение химического потребления кислорода (ХПК) проводили бихроматным методом в соответствии с описанием, приведенным в [7]. Количество жиров и масел в сточной воде определили в соответствии с методикой, описанной в [7].

Для получения биомассы микроорганизмов-деструкторов жировых веществ посевной материал готовили следующим образом: биомассу микроорганизмов, выращенную на скошенной агаризованной среде, смывали в жидкую минеральную среду Мейнелла следующего состава

(г/л): меласса – 30,0;  $K_2HPO_4$  – 7,0;  $KH_2PO_4$  – 3,0;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  – 0,1;  $(NH)_2SO_4$  – 1,5; натрий лимонно-кислый – 0,5. Культивирование *Rhodococcus sp.* P1–3ФН, *Rhodococcus ruber* 2В и *Bacillus subtilis* 6/2-АПФ1, *Pseudomonas putida* 10АП вели в колбах Эрленмейера объемом 2 л в шейкере-инкубаторе при температуре 28°C, 150 об/мин в течение 96 и 48 ч соответственно.

Полученную суспензию микроорганизмов использовали в качестве посевного материала для получения биомассы микроорганизмов-деструкторов с целью отработки параметров глубинного культивирования в ферментерах типа LiFlusSP 100L.

**Результаты и их обсуждение.** Культивирование микроорганизмов в питательной среде Мейнелла, содержащей в качестве источника жировых веществ растительные и животные масла, показало, что микроорганизмы рода *Rhodococcus ruber* 2В и *Rhodococcus sp.* P1–3ФН наиболее активно использовали моторное масло. Масло животного происхождения – сливочное, наиболее активно использовал штамм микроорганизмов *Bacillus subtilis* 6/2-АПФ1, а растительное масло – штамм *Pseudomonas putida* 10 АП.

Определение липолитической активности у отобранных бактерий подтвердило наличие липазы у штаммов, активно растущих на жировых веществах. Об этом свидетельствуют зоны гидролиза, образуемые вокруг колоний исследуемых культур микроорганизмов в диаметре более 15 мм за счет участия бактериальных экзоферментов.

Максимальная активность липазы среди исследованных штаммов микроорганизмов обнаружена у *Rhodococcus sp.* P1–3ФН (табл.1).

Т а б л и ц а 1. Активность липазы у микроорганизмов, растущих на жировых веществах

| Штаммы микроорганизмов            | Удельная активность, ед/мг белка |
|-----------------------------------|----------------------------------|
| <i>Bacillus subtilis</i> 6/2-АПФ1 | 0,68 ± 0,04                      |
| <i>Pseudomonas putida</i> 10АП    | 0,65 ± 0,04                      |
| <i>Rhodococcus sp.</i> P1–3ФН     | 0,72 ± 0,04                      |
| <i>Rhodococcus ruber</i> 2В       | 0,70 ± 0,03                      |

Штаммы *Rhodococcus sp.* P1–3ФН, *Rhodococcus ruber* 2В, *Bacillus subtilis* 6/2-АПФ1, *Pseudomonas putida* 10АП, способные к активному росту на синтетической среде с различными источниками жировых веществ и обладающие липазной активностью, свидетельствующей о способности трансформировать молекулу жиров, были оценены нами как наиболее перспективные для создания на их основе микробного препарата – биодеструктора жировых веществ. Для разработки технологии производства микробных препаратов важное значение имеет определение оптимальных условий выращивания составляющих их культур с целью получения максимального выхода биомассы микроорганизмов, обладающих высокой деструктивной активностью.

Среди 4 широко используемых для выращивания микроорганизмов питательных сред (Е-8, М9, Раймонда, Мейнелла) в качестве наиболее оптимальной для глубинного культивирования *Rhodococcus sp.* P1–3ФН, *Rhodococcus ruber* 2В, *Bacillus subtilis* 6/2-АПФ1, *Pseudomonas putida* 10АП выбрана среда Мейнелла.

Исследования по оптимизации условий культивирования микроорганизмов – *Rhodococcus ruber* 2В, *Rhodococcus sp.* P1–3ФН, *Pseudomonas putida* 10 АП, *Bacillus subtilis* 6/2-АПФ1 – показали, что микроорганизмы рода *Rhodococcus* (*R. ruber* 2В и *R. sp.* P1–3ФН) активно растут при совместном культивировании. При выращивании родококков на среде с 1,0 – 40,0 г/л мелассы установлена возможность получения оптимального количества биомассы культур на среде, содержащей 10 г/л мелассы, что способствует значительному удешевлению среды для культивирования данных микроорганизмов (табл. 2).

Оптимальной для ведения процесса культивирования родококков является интенсивность перемешивания при 150 об/мин. Увеличение интенсивности перемешивания среды приводит к нарушению процесса массообмена в ней в связи с образованием конгломератов шарообразной формы из биомассы культивируемых родококков.

Уровень аэрации среды, исследованный в диапазоне 25–40 м<sup>3</sup> воздуха/1 м<sup>3</sup> среды/ч, оптимален для культивирования родококков при подаче в среду 30 м<sup>3</sup> воздуха, обеспечивающей наличие в 1 л среды 3 мг О<sub>2</sub> (табл. 3).

Т а б л и ц а 2. Влияние концентрации мелассы на рост микроорганизмов-деструкторов жировых веществ рода *Rhodococcus*

| Концентрация мелассы, г/л | Биомасса, г/л (96 ч)        |                               |
|---------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
|                           | <i>Rhodococcus ruber</i> 2В | <i>Rhodococcus sp.</i> P1-3ФН |
| 1                         | 4,32 ± 0,06                 | 4,73 ± 0,05                   |
| 5                         | 5,04 ± 0,08                 | 5,18 ± 0,07                   |
| 10                        | 6,33 ± 0,08                 | 6,46 ± 0,06                   |
| 20                        | 6,49 ± 0,06                 | 6,50 ± 0,08                   |
| 30                        | 6,52 ± 0,05                 | 6,54 ± 0,06                   |
| 40                        | 6,52 ± 0,09                 | 6,55 ± 0,06                   |

Т а б л и ц а 3. Влияние аэрации на рост микроорганизмов-деструкторов жировых веществ рода *Rhodococcus*

| Интенсивность аэрации, м <sup>3</sup> воздуха/ м <sup>3</sup> среды/ч | Биомасса, г/л (96 ч)        |                               |
|---|-----------------------------|-------------------------------|
|   | <i>Rhodococcus ruber</i> 2В | <i>Rhodococcus sp.</i> P1-3ФН |
| 25  | 4,53 ± 0,08                 | 4,69 ± 0,06                   |
| 30  | 6,58 ± 0,06                 | 6,62 ± 0,06                   |
| 40  | 6,59 ± 0,08                 | 6,62 ± 0,05                   |

Раздельное и совместное культивирование *Pseudomonas putida* 10 АП, *Bacillus subtilis* 6/2-АПФ1 в среде Мейнелла обеспечивает возможность получения практически равного количества биомассы: через 48 ч титр клеток составлял в среде не менее  $1 \cdot 10^9$  КОЕ/мл. Наибольший выход биомассы данными микроорганизмами достигается при следующих условиях культивирования в ферментере: скорость вращения мешалки 150 об/мин, количество подаваемого воздуха 0,5 л/л среды/мин.

Оптимальные условия для роста и проявления деструктивной активности *Rhodococcus ruber* 2В, *Rhodococcus sp.* P1-3ФН, *Pseudomonas putida* 10 АП, *Bacillus subtilis* 6/2-АПФ1 в среде Мейнелла достигаются при исходной активной кислотности питательной среды 7,0, температуре культивирования 28°C.

Отработку технологических параметров культивирования исследованных микроорганизмов осуществляли в производственных условиях Биотехнологического центра Института микробиологии НАН Беларуси. Культивирование 4 культур провели в 2 отдельных ферментерах типа LiFlusSP 100L. Совместно в одном ферментере культивировали *Pseudomonas putida* 10 АП и *Bacillus subtilis* 6/2-АПФ1, а в другом – *Rhodococcus ruber* 2В и *Rhodococcus sp.* P1-3ФН.

Оптимальными условиями как раздельного, так и совместного культивирования *Pseudomonas putida* 10 АП и *Bacillus subtilis* 6/2-АПФ1 являются: интенсивность аэрации 0,5 л воздуха/л среды/мин, скорость вращения мешалки 150±20 об/мин, температура 28±2°C, pH 6,5–7,0. Продолжительность культивирования микроорганизмов составляет 48 ч. Выращивание бактерий в оптимизированных условиях позволяет получить культуральную жидкость *Pseudomonas putida* 10 АП, *Bacillus subtilis* 6/2-АПФ1с титром 6,0 – 7,2 · 10<sup>9</sup> клеток/мл.

Микроорганизмы рода *Rhodococcus* – *Rhodococcus ruber* 2В и *Rhodococcus sp.* P1-3ФН активно росли как при раздельном, так и совместном культивировании в среде Мейнелла. Оптимальные условия культивирования данных штаммов в ферментере типа LiFlusSP 100L – интенсивность аэрации 0,5 л воздуха/л среды/мин, скорость вращения мешалки – 100±20 об/мин, температура – 28±2°C, pH 6,6–7. Продолжительность культивирования микроорганизмов рода *Rhodococcus* – 96 ч, что обеспечивает получение титра в культуральной жидкости, составляющего 8,2 – 9,5 · 10<sup>9</sup> клеток/мл.

Исследования деструктивной активности изучаемых 4 штаммов провели в делительных воронках объемом 0,5 л в условиях постоянного поддержания стойкой эмульсии. Установлено, что модельная сточная вода с исходным уровнем загрязненности по ХПК, равным 2000 мг O<sub>2</sub>/л, очищается при использовании вышеперечисленных микроорганизмов до значения ХПК 450 мг O<sub>2</sub>/л штаммом *Bacillus subtilis*. 6/2 АПФ-1 на 73 %, *Rhodococcus ruber* 2В на 49 %, *Rhodococcus sp.* P1-3ФН на 50 %, *Pseudomonas putida* 10 АП на 60%, смесью культур на 78 %.

Исследование динамики утилизации жировых веществ в составе органического вещества сточной воды, поступающей на БОС КУП «Копыльское ЖКХ» с уровнем загрязненности по ХПК 398 мг О<sub>2</sub>/л, показало, что наиболее активно она протекала при обработке стока смесью биомассы микроорганизмов, *Rhodococcus ruber* 2В, *Rhodococcus sp. PI-3ФН*, *Pseudomonas putida* 10 АП, *Bacillus subtilis* 6/2-АПФ1. Последовательное снижение уровня ХПК через 8, 16 и 24 ч составляло 32,5; 62,5; 81,2 %.

**Заключение.** Проведенная оптимизация глубинного культивирования микроорганизмов-деструкторов жировых веществ позволяет осуществлять наработку культуральной жидкости бактерий *Rhodococcus ruber* 2В, *Rhodococcus sp. PI-3ФН*, *Pseudomonas putida* 10 АП, *Bacillus subtilis* 6/2-АПФ1 с высоким титром (не менее 1·10<sup>9</sup> клеток/мл), обладающих деструктивной активностью, обеспечивающей снижение ХПК в сточной воде, содержащей жировые вещества на 81,2 % за 24 ч.

## Литература

1. Пальгунов Н. В., Абрамов А. Н. // Экология и промышленность России. 2000. № 12. С. 4–6.
2. Ивчатов А. Л., Гляденов, С. Н. // Экология и промышленность России. 2003. № 4. С. 37–40.
3. Поскрякова Н. В. Разработка основы биопрепарата для деструкции жиров: Автореф. дис... канд. биол. наук. Уфа, 2007.
4. Биотехнологический способ очистки сточных вод от масел и жиров: пат. RU 2161595, МПК С2 С 02F 3/34, С 12N 1/20 / Мурзаков Б. Г., Заикина А. И., Зобнина В. П., Листов Е. Л., Зорина Л. В., Рогачева Р. А.; заявитель Российско-японская компания ЗАО «Биотэк-Япония». № 0024673; заявл. 04.03.99; опубл. 30.04.2001 // Офиц. бюл. 2001.
5. Методы общей бактериологии: Пер. с англ. / Под ред. Ф. Герхардта и др. М., 1983.
6. Лабораторный практикум по технологии ферментных препаратов: Учеб. пособие для вузов / И. М. Грачева, Ю. П. Грачев, М. С. Мосичев и др. М., 1982.
7. Лурье Ю. Ю. Аналитическая химия промышленных сточных вод. М., 1984.

A. S. SAMSONOVA

## OPTIMIZATION OF CONDITIONS FOR SUBMERGED FERMENTATION OF MICROORGANISMS DEGRADING LIPID SUBSTANCES

### Summary

Optimal conditions for growth and degrading activity of microbial strains decomposing lipid substances *Rhodococcus ruber* 2В, *Rhodococcus sp. PI-3FN*, *Pseudomonas Putida* 10 АП, *Bacillus subtilis* 6/2 АПФ1 were achieved during submerged culture in Meynell medium with initial active acidity pH 7.0, at temperature 28 °С, aeration rate 0.5 l air/l medium/min, aqitation rate – 150 rpm and fermentation time 48h for *Pseudomonas Putida* 10 АП, *Bacillus subtilis* 6/2 АПФ1 and 96h for *Rhodococcus ruber* 2В and *Rhodococcus sp. PI-3FN*.