

ПОЛУЧЕНИЕ ЛИПОФИЛЬНОГО БАКТЕРИАЛЬНОГО КОНСОРЦИУМА ДЛЯ УТИЛИЗАЦИИ ЖИРОВЫХ ОТЛОЖЕНИЙ

^{1,2}Герасимчук А.Л., ¹Анциферов Д.В., ¹Бухтиярова П.А., ^{1,2}Ивасенко Д.А.

¹ТомБиоТех, г. Томск, Российская Федерация

²Томский государственный университет, г. Томск, Российская Федерация

Аннотация. Обладающие липолитической активностью бактериальные штаммы *Pseudomonas citronellolis* A13, *Pseudomonas extremaustralis* B11, *Pseudomonas nitroreducens* D14, *Pseudomonas* sp. B21, *Microvirgula curvata* B37, *Brevibacillus* sp. 28Д, *Bacillus subtilis* spp. B10, B34, выделенные из жиросодержащих сточных вод пищевых предприятий, были использованы для получения липофильного бактериального консорциума, перспективного для утилизации жировых отложений.

Ключевые слова. Липофильные консорциумы микроорганизмов, липолитическая активность, утилизация жиров, очистка сточных вод пищевых предприятий

OBTAINING A LIPOPHILIC BACTERIAL CONSORTIUM FOR FAT DEPOSITS UTILIZATION

^{1,2}Gerasimchuk A.L., ¹Antsiferov D.V., ¹Bukhtiyarova P.A., ^{1,2}Ivasenko D.A.

¹TomBioTech, Tomsk, Russian Federation

²Tomsk state university, Tomsk, Russian Federation

Annotation. Bacterial strains with lipolytic activities *Pseudomonas citronellolis* A13, *Pseudomonas extremaustralis* B11, *Pseudomonas nitroreducens* D14, *Pseudomonas* sp. B21, *Microvirgula curvata* B37, *Brevibacillus* sp. 28Д, *Bacillus subtilis* spp. B10, B34 were isolated from fat-containing industrial wastewater of food industry and were used for obtaining a lipophilic bacterial consortium that perspective for fat deposits utilization.

Отходы предприятий пищевой промышленности (мясоперерабатывающая, молочная промышленность) и предприятий общественного питания служат основным источником животного жира и растительных масел в системах канализации. Поступающие в канализацию жиры и масла могут подвергаться химическим реакциям с другими компонентами, содержащимися в сточных водах, с образованием твердых жировых отложений, которые приводят к закупорке труб и, как следствие, к переполнению канализационных коллекторов. Вместе с неочищенными сточными водами из систем канализации в окружающую среду попадают загрязняющие вещества и патогенные микроорганизмы [1]. Проблема очистки жиросодержащих сточных вод и утилизации жировых отложений чаще всего решается физико-химическими методами, хотя существующие биологические способы очистки на основе использования специализированных микроорганизмов имеют большой потенциал для применения [2-6]. Сточные воды с высоким содержанием жира могут быть источником выделения промышленно значимых штаммов липофильных микроорганизмов. Ограничивающим фактором для внедрения специализированных биопрепаратов на основе микроорганизмов, утилизирующих разные виды жиров, является патогенность многих липофильных штаммов.

Целью данной работы было получение липофильного бактериального консорциума, состоящего из непатогенных штаммов и активно расщепляющего жиры в широком диапазоне значений pH (5-9) и температур (15-55 °С) и перспективного для применения в качестве биопрепарата для утилизации жировых отложений. Были поставлены следующие задачи: 1. Сконструировать несколько консорциумов на основе имеющихся липофильных штаммов бактерий. 2. Провести анализ липолитической активности консорциумов микроорганизмов при разных условиях культивирования. 3. Провести эксперимент по утилизации жировых отложений в лабораторных условиях.

Для конструирования консорциумов использованы 8 липофильных штаммов бактерий, выделенных нами ранее из сточных вод предприятий пищевой промышленности г. Томска (данные не опубликованы), а именно спорообразующие штаммы *Bacillus subtilis* M22, *B. subtilis* B10, *Brevibacillus* sp. 28Д и не образующие спор штаммы *Pseudomonas citronellolis* A13, *P. extremaustralis* B11, *P. nitroreducens* D15, *Pseudomonas* sp. B21 и *Microvirgula curvata* B37. Выделенные штаммы близкородственны (на основе сравнения близких к полным последовательностей генов 16S рПНК) микроорганизмам, обладающим

рядом уникальных свойств и имеющих большой потенциал для биодegradации не только жиров, но и других органических веществ [7-12].

Из отобранных бактериальных штаммов сконструировали 3 консорциума. Консорциум 1 включал спорообразующие штаммы *Bacillus* (2 штамма) и *Brevibacillus* (1 штамм), консорциум 2 – только неспоровые штаммы *Pseudomonas* (4 штамма) и *Microvirgula* (1 штамм), консорциум 3 представлял смесь всех 8 отобранных перспективных штаммов. Для выявления наиболее продуктивного консорциума, а также определения оптимальных условий для роста были проведены эксперименты по культивированию при разных температурных условиях и значениях pH. Также была определена липолитическая активность и способность утилизировать разные виды жиров.

Для культивирования консорциумов использовали жидкую минеральную среду следующего состава: 0,625 г/л NH_4Cl , 0,0025 г/л CaCl_2 , 0,005 г/л MnCl_2 , 0,05 г/л $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0,0025 г/л $\text{FeSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$, 1,25 г/л NaCl , 2,5 г/л Na_2HPO_4 , 0,25 г/л KH_2PO_4 , с добавлением 1 % свиного жира в качестве источника углерода. Эксперимент проводили на следующих вариантах температур: +15 °C, +28 °C, +55 °C.

Консорциумы культивировали в 500-мл стеклянных бутылках при нейтральном значении pH (7-7,5). В объем питательной среды 250 мл вносили в качестве инокулята равные количества биомассы каждого штамма общей численностью не менее 10^8 кл/мл. В качестве контроля для всех температурных условий инкубировали неинокулированную питательную среду. В нулевой точке и каждые последующие сутки определяли численность микроорганизмов, основные доминирующие морфотипы и липолитическую активность. Общая продолжительность эксперимента составила 17 суток.

Для определения диапазона pH выбрали значения 5,5 и 9,5 единиц при температуре 28 °C. Продолжительность культивирования составила 15 суток.

Подсчет клеток проводили методом фазового контраста с помощью микроскопа «Биомед 6» с увеличением $\times 1000$. Липолитическую активность определяли по методу Ота-Ямада [13]. Расчет активности проводили по формуле [14].

В ходе эксперимента было показано, что все три консорциума способны к росту и функционированию в диапазоне от 15 до 55 °C, однако консорциумы 2 и 3 отличаются более высокими показателями роста на всех исследованных температурах (рис. 1А). Для обоих консорциумов при всех температурах наблюдали максимальную численность через 9-10 суток от начала культивирования. Наиболее высокие показатели численности при 15 °C и +55 °C обнаружены в консорциуме 2, при +28 °C – в консорциумах 2 и 3, в остальных вариантах максимальная численность была ниже незначительно.

Анализ кривых роста (данные не представлены) консорциумов при слабокислом (pH 5,5) и щелочном значении pH (pH 9,5) показал, что в консорциуме 1 в обоих вариантах значений pH рост был очень слабым, численность микроорганизмов не превышала $3,4 \times 10^5$ кл/мл. Консорциум 2 характеризовался наибольшим приростом численности, максимальные значения составили $3,3 \times 10^7$ кл/мл при pH 5,5 и $8,42 \times 10^7$ кл/мл при pH 9,5. Консорциум 3 при слабокислом значении pH образовывал больше биомассы (максимальная численность $3,3 \times 10^7$ кл/мл), чем при слабощелочном pH среды (максимальная численность $1,63 \times 10^7$ кл/мл).

Для всех вариантов консорциумов максимальная липолитическая активность обнаружена в первые двое суток культивирования (рис. 1Б). Максимальные измеренные значения составили 23,5 мкмоль/ч×мл (консорциум 2). Для консорциума 1 максимальные значения активности липазы составили 18,5 мкмоль/ч×мл при 15 °C и 28 °C и 21,83 мкмоль/ч×мл при 55 °C, для консорциума 2 – 23,5 мкмоль/ч×мл при всех температурах, для консорциума 3 – 15,17 мкмоль/ч×мл, 16,83 мкмоль/ч×мл и 18,5 мкмоль/ч×мл при температурах 15 °C, 28 °C и 55 °C, соответственно. Второй пик активности, но с меньшими значениями, наблюдался после 12 суток культивирования, в консорциуме 1 – на 16-е сутки при температуре 15 °C и 5-е сутки при pH 5,5. Такие результаты могут быть связаны с реакцией бактериальных клеток на стресс в виде инокулирования свежей питательной средой с содержанием жира. Высвобожденные липазы начинают расщеплять жиры до жирных кислот, далее в процессе культивирования их содержание становится меньше. Второй пик высвобождения липаз может свидетельствовать об истощении свободных жирных кислот, расходуемых на метаболизм, и необходимость в расщеплении остатков жира.

Для консорциумов, культивированных при разных значениях pH, также отмечено два пика максимальной липолитической активности, однако в другие временные отрезки (рис. 2). При pH 5,5 во всех трех консорциумах отмечена максимальная липолитическая активность на 5-е сутки культивирования. При этом измеренные значения активности липазы были очень близки во всех консорциумах и составляли от 17,5 до 20 мкмоль/ч×мл. Второй пик активности в консорциуме 1 ($3,33 \pm 0,06$ мкмоль/ч×мл при pH 5,5 и 9,5) наблюдался через 15 суток культивирования, в консорциумах 2 и 3 при pH 5,5 отмечен всплеск активности до 15 мкмоль/ч×мл на 23-и сутки культивирования (не показано на рисунке). При pH 9,5 во всех консорциумах максимальная измеренная липолитическая

активность обнаружена через сутки культивирования, наиболее высокие значения показаны для консорциума 2 и не превышали 19 мкмоль/ч×мл.

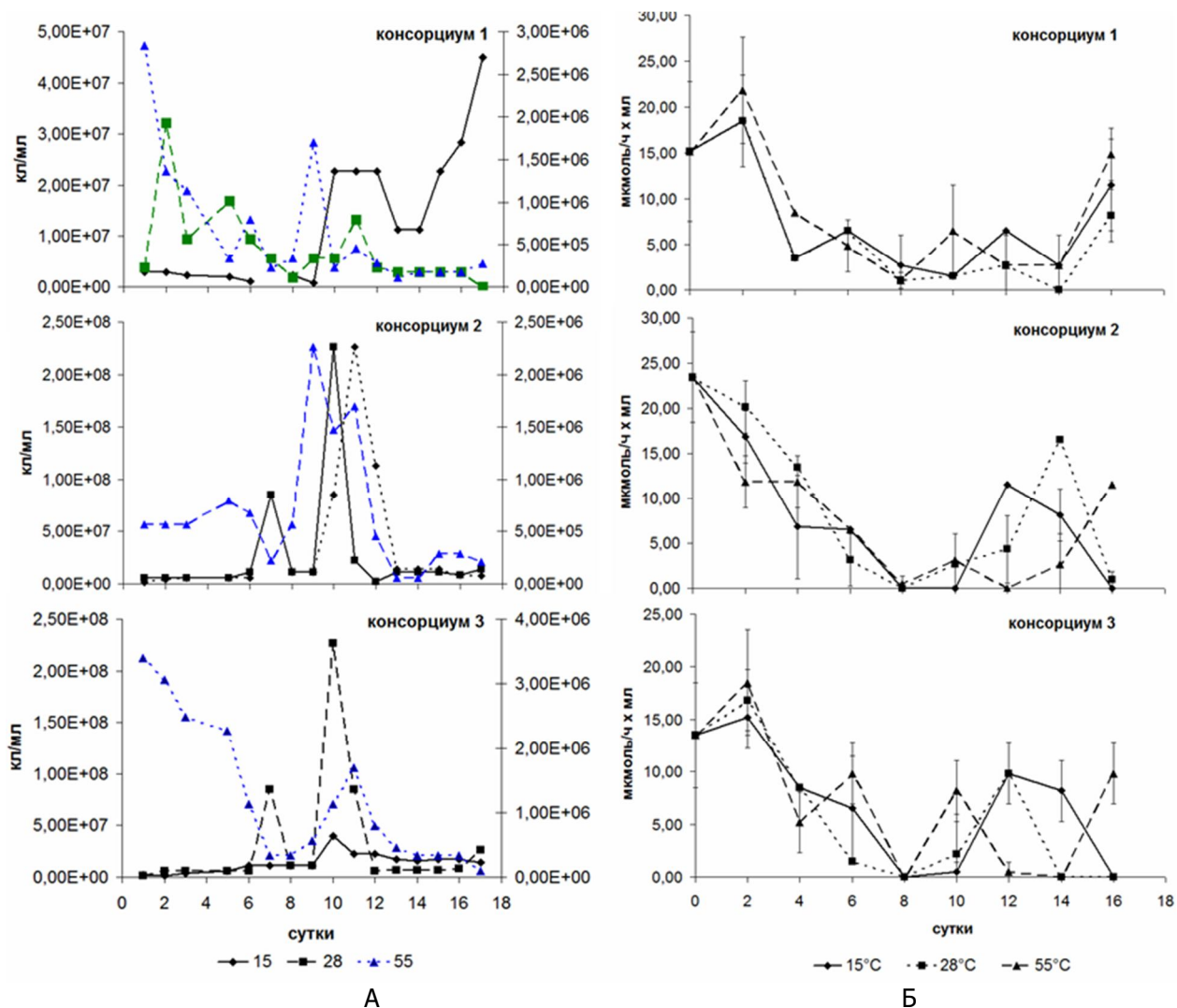


Рисунок 1 – Кривые роста консорциумов при разных температурах. А – Прирост численности (цветом выделены кривые, построенные по вспомогательной оси). Б – Измеренная липолитическая активность

Таким образом, в присутствии 1 % свиного жира для консорциума 2 показана максимальная измеренная липолитическая активность при всех исследованных температурах и значениях pH.

Следующим этапом было изучение способности консорциумов к деструкции разных видов жира, а именно свиного жира (10 %), растительного (10 %) и молочного (7,2 %). Объем питательной среды для культивирования каждого консорциума на трех разных средах составил 300 мл. В качестве контроля выступала неинокулированная питательная среда с добавлением разных источников жира. Консорциумы культивировали на протяжении 5 суток, затем из культуральной жидкости остатки жира экстрагировали с помощью тетрахлорметана, полученный концентрат использовали для анализа общего количества жира. Анализ количества жира до и после деструкции показал, что свиной жир одинаково хорошо разлагался всеми консорциумами при исходных нейтральных значениях pH, эффективность деструкции составила 70-85 % за 5 суток культивирования. Молочный и растительный жиры разлагались хуже, эффективность деструкции 37-44 % и 43-54 %, соответственно. Наиболее высокие значения по эффективности деструкции при всех изученных условиях показаны для консорциума 3.

Таким образом, в ходе проведенной работы были сконструированы 3 липофильных бактериальных консорциума и оценена их способность к биодеструкции жиров в широком диапазоне значений pH (5-9) и температур (15-55 °C). Проведенные исследования показали, что консорциум 2 (включающий штаммы *Pseudomonas* и *Microvirgula*) и консорциум 3 (содержащий штаммы *Bacillus* и *Brevibacillus*, *Pseudomonas* и *Microvirgula*) являются перспективными для разработки биопрепарата для утилизации жирно-содержащих отходов.

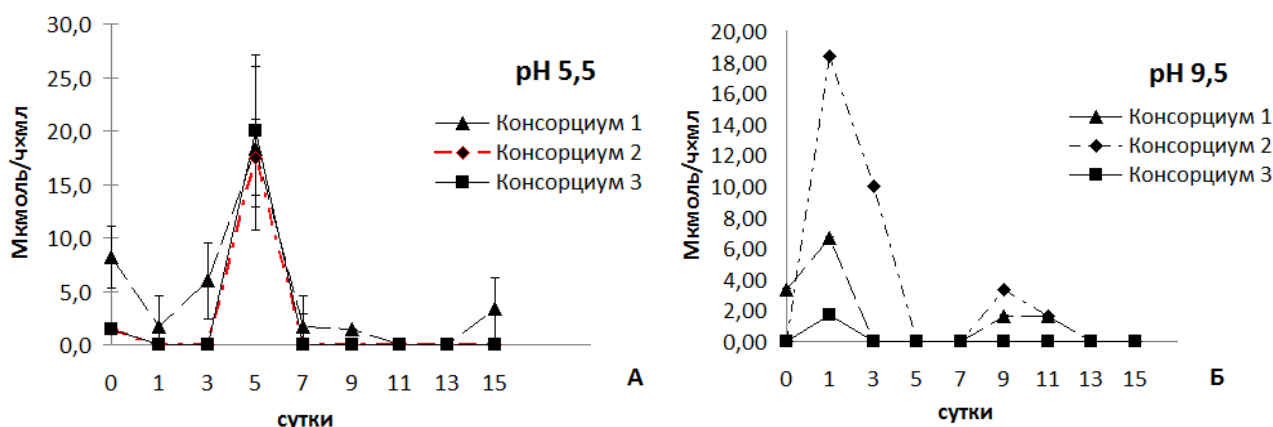


Рисунок 2 - Изменение липолитической активности консорциумов в зависимости от значений рН

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. A critical review of fat, oil and grease (FOG) in sewer collection systems: challenges and control / X. He et al. // *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. – 2017. – Vol. 47, N13. – P. 1191-1217.
2. Behavior of lipids in biological wastewater treatment processes / K. B. Chipasa, K. Medrzycka // *J Ind Microbiol Biotechnol*. – 2006. – V. 33. – P. 635–645.
3. Degradation and modification of fats, oils and grease by commercial microbial supplements / A.M. Brooksbank et al. // *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. – 2007. - Vol. 23, N7. – P. 977-985.
4. Cell immobilized FOG-trap system for fat, oil, and grease removal from restaurant wastewater / G.M. Nisola [et al.] // *Journal of Environmental Engineering*. – 2009. – Vol. 135, N9. – P. 876-884.
5. Use of Bio-Amp, a commercial bio-additive for the treatment of grease trap wastewater containing fat, oil, and grease / H.L. Tang et al. // *Bioresource Technology*. – 2012. – Vol. 124. – P. 52-58.
6. Impact of microbial activities and hydraulic retention time on the production and profile of long chain fatty acids in grease interceptors: a laboratory study [Text] / X. He, T. Yan // *Environmental Science Water Research and Technology*. – 2016. – Vol. 2. – P. 474–482.
7. Complete genome sequence of *Pseudomonas citronellolis* P3B5, a candidate for microbial phyllo-remediation of hydrocarbon-contaminated sites / M.N.P. Remus-Emsermann et al. // *Standards in Genomic Sciences*. – 2016. – V. 11. – P. 75.
8. Genome sequence of *Pseudomonas citronellolis* SJTE-3, an estrogen and polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium / D. Zheng et al. // *Genome Announcements*. – 2016. – V. 4, I. 6. – P. e01373-16.
9. A polyhydroxybutyrate-producing *Pseudomonas* sp. isolated from Antarctic environments with high stress resistance / N.D. Ayub, M.J. Pettinari, J.A. Ruiz, N.I. López // *Curr Microbiol*. – 2004. – V. 49. – P. 170-174.
10. Biofilm lifestyle enhances diesel bioremediation and biosurfactant production in the Antarctic polyhydroxyalkanoate producer *Pseudomonas extremaustralis* / P.M. Tribelli et al. // *Biodegradation*. – 2012a. – V. 23. – P. 645-651.
11. Comparative genome analysis of *Pseudomonas knackmussii* B13, the first bacterium known to degrade chloroaromatic compounds / R. Miyazaki et al. // *Environ. Microbiol*. – 2015. – V. 17. – P. 91-104.
12. Implications of a novel *Pseudomonas* species on low-density polyethylene biodegradation: an *in vitro* to *in silico* approach / M. Bhatia et al. // *Springer Plus*. – 2014. – V. 3. – P. 497.
13. Ферментативный катализ в ЦБП: учебно - методическое пособие / Е.Ю. Демьянцева, Р.А. Копнина. – СПб. : СПбГТУРП., 2014. – 47 с.
14. Методические особенности определения активности липаз в семенах рапса / А.И. Никитенко и др. // *Труды БГУ. Химия, технология органических веществ и биотехнология*. – 2011. – Т. 4. – С. 190-193.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Фонда содействия инновациям в рамках договора № 2575ГС1/41327.