

## **ВЫДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ ОСНОВНЫХ СВОЙСТВ ЛИПИДООКИСЛЯЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ**

**Орлова С.Н., Герман Н.В., Владимцева И.В., Колотова О.В., Бойкова И.С.**

*ФГБОУ ВПО Волгоградский государственный технический университет, Волгоград, Россия (400005, г. Волгоград, просп. им. Ленина, 28), e-mail: alexvlad32@yandex.ru*

**Из надосадочной жидкости активного ила городских очистных сооружений, смыва с производственной мясорубки Волгоградского мясокомбината и сточной воды Волгоградского кожевенного завода на селективных питательных средах проведено выделение 30 липолитических бактериальных штаммов. На основании изучения жирокисляющей способности в бульоне Штерна отобрано три культуры, исследованы их основные культуральные, морфологические и липолитические свойства. На селективной питательной среде выявлен наиболее активный липидоокисляющий штамм, осуществлена его идентификация, которая позволила отнести культуру к роду *Bacillus*. Проведено клонирование, мутагенез и селекция выделенного бактериального штамма. Получен высокопродуктивный клон, перспективный для дальнейших исследований с целью создания бактериального препарата, эффективно разлагающего жировые загрязнения сточных вод.**

Ключевые слова: липидоокисляющие микроорганизмы, сточные воды, селективные питательные среды.

## **ISOLATION AND STUDY OF BASIC PROPERTIES LIPASE PRODUCING MICROORGANISMS**

**Orlova S.N., German N.V., Vladimtseva I.V., Kolotova O.V., Boikova I.S.**

*Volgograd State Technical University, Volgograd, Russia (400131, Volgograd, prosp. Lenina, 28), e-mail: alexvlad32@yandex.ru*

**From the supernatant of activated sludge municipal wastewater treatment plants, flush with industrial grinder Volgograd slaughterhouse and wastewater Volgograd tannery on selective nutrient media conducted allocation of 30 lipolytic bacterial strains. Based on the study oxidation fat ability broth Stern selected three cultures, investigated their basic culture, morphological and lipolytic properties. On selective medium revealed lipase producing bacteria most active strain, carried his identification, which allowed culture attributed to the genus *Bacillus*. Cloned, mutagenesis and selection selected bacterial isolates. Obtained by high-yielding clone, promising for further research to establish the bacterial preparation, effectively decomposing grease wastewater.**

Keywords: lipase producing microorganisms, waste water, selective nutrient media.

### **Введение**

Сточные воды пищевых производств (кондитерских, масложировых, молочных, мясоперерабатывающих, рыбообрабатывающих и др.) содержат высокие концентрации жировых веществ. Недостаточная очистка стоков от жира приводит к образованию пробок в канализационных трубах и коммуникациях, появлению неприятного запаха в результате гниения жировых осадков, нарушению технологических параметров работы очистных сооружений [1]. Существующие системы очистки не обеспечивают полного извлечения жировых веществ, а только позволяют снизить их концентрацию. Во многих случаях природная среда не справляется с все нарастающим потоком загрязнений, и создаются условия для нарушения экологического равновесия в биосфере [2].

Биологическая очистка сточных вод основана на способности микроорганизмов использовать растворенные и коллоидные органические загрязнения в качестве источника

питания в процессах своей жизнедеятельности, она имеет ряд важных преимуществ перед другими методами [2, 4]. Микроорганизмы осуществляют полную деструкцию загрязнения до газообразных продуктов и воды, обеспечивая тем самым круговорот элементов в природе. При биологической очистке, в отличие от других способов, не происходит концентрации загрязнений или перевода их в другую форму. Биологические методы наиболее экономичны, так как, за исключением основных капиталовложений, почти не требуют расходов во время эксплуатации сооружений, а главный действующий компонент биологической очистки – активный ил – самовоспроизводится.

В настоящее время существует большой рынок коммерческих микробных препаратов, но, несмотря на это, продолжается поиск новых штаммов-жиродеструкторов, обладающих высокой окислительной способностью по отношению к широкому спектру липидов и липидоподобных соединений. Поэтому пополнение микробной коллекции свежевыделенных штаммов липидоокисляющих микроорганизмов для последующего применения их в процессах очистки жиросодержащих сточных вод предприятий пищевой промышленности является весьма актуальным.

Целью данной работы было выделение и изучение основных свойств микроорганизмов, способных утилизировать липиды.

#### **Материалы и методы исследования**

Липидоокисляющие микроорганизмы выделяли из трех источников: надосадочной жидкости активного ила городских очистных сооружений, смыва с производственной мясорубки Волгоградского мясокомбината и сточной воды Волгоградского кожевенного завода.

Выделение жирорасщепляющих бактериальных штаммов производили на трех селективных плотных питательных средах, содержащих в качестве единственного источника углерода свиной, говяжий жир или кожную мзду и минеральные соли. Селективные питательные среды с жиром готовили следующим образом: жир стерилизовали в сухожаровом шкафу при температуре 120 °С в течение 20 мин. и разливали в чашки Петри. Агар – агар с минеральными компонентами смешивали отдельно, доводили до кипения, стерилизовали в автоклаве при 120 °С в течение 15 минут, остужали до 50 °С и выливали на застывшие пластинки с жиром.

Селективную среду, содержащую кожную мзду, готовили по следующей методике: мзду и минеральные соли (г/л):  $\text{NH}_4\text{Cl}$  – 0,625;  $\text{CaCl}_2$  – 0,0025;  $\text{MnCl}_2$  – 0,005;  $\text{MgSO}_4$  – 0,05;  $\text{FeSO}_4$  – 0,0025;  $\text{NaCl}$  – 1,25;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  – 2,5;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0,25 кипятили в течение 1 мин, постоянно перемешивая, и стерилизовали автоклавированием при 1 атм в течение 15 мин.

Методика выделения микроорганизмов заключалась в высеве проб сточной воды, надосадочной жидкости активного ила или смыва с оборудования мясокомбината в объеме 1 мл на приготовленные селективные среды. Посевы инкубировали в течение 24 ч при 27 °С и 48 ч при комнатной температуре (18 °С), после чего проводили визуальный анализ выросших колоний. Изолированные колонии бактериологической петлей были отсеяны на скошенный агар для выделения чистых культур микроорганизмов.

С целью исследования культуральных свойств из чистых культур с помощью бактериального стандарта мутности готовили взвеси с концентрацией  $10^9$  микробных клеток (м.к.) в 1 мл, которые были десятикратно разведены в физиологическом растворе и высеяны на пластинки питательного агара в чашки Петри для получения изолированных колоний. Культурные свойства выделенных штаммов оценивали, анализируя внешний вид колоний (поверхность, размер, цвет, характер края, наличие складчатости).

Морфологические свойства культур определяли по результатам окраски по Грамму и микроскопирования в проходящем свете оптического микроскопа МЛ-1 (ЛОМО, г. Санкт-Петербург).

Липолитические свойства выделенных бактериальных штаммов оценивали по результатам роста в бульоне Штерна, в котором в качестве единственного источника углерода использовали оливковое масло с концентрацией 1 мл в 100 мл бульона. Бактерии, обладающие липолитическими свойствами, при ферментации оливкового масла выделяют альдегиды, подкисляя среду. Стерильный бульон Штерна разливали в пробирки по 10 мл в каждую и вносили исследуемые культуры в объеме 0,1 мл с концентрацией  $10^9$  м.к. в 1 мл. Пробирки с микроорганизмами термостатировали при температуре 27 °С в течение 120 ч и проводили наблюдение за изменением рН бульона Штерна. В качестве контрольного варианта использовали бульон Штерна без внесения в него микроорганизмов.

Биохимические свойства выделенных бактериальных штаммов изучали по стандартным методикам, описанным в руководстве [3]. Идентификацию микроорганизмов проводили, используя определитель Берджи [5].

Интенсивность роста и накопления биомассы микроорганизмов оценивали макрокультуральным методом, подсчитывая колонии, выросшие после посева проб культуральной жидкости на плотную питательную среду и фотокolorиметрическим методом на приборе КФК-2-УХЛ-4.2 при длине волны светофильтра 670 нм в кюветах с длиной оптического пути 5,065 мм.

### **Результаты и их обсуждение**

В результате первичного анализа культуральных и морфологических свойств микроорганизмов, выросших на экспериментальных селективных средах, было выделено 30

бактериальных культур: 6 штаммов – из надосадочной жидкости активного ила городских очистных сооружений, 17 культур – из смыва с производственного оборудования Волгоградского мясокомбината и 7 штаммов – из сточной воды Волгоградского кожевенного завода.

При изучении липолитической активности штаммов с использованием бульона Штерна были отобраны наиболее активные деструкторы жира в каждом из источников выделения. На рисунке в качестве примера приведены результаты сравнения липолитической активности шести бактериальных штаммов, выделенных из надосадочной жидкости активного ила городских очистных сооружений.

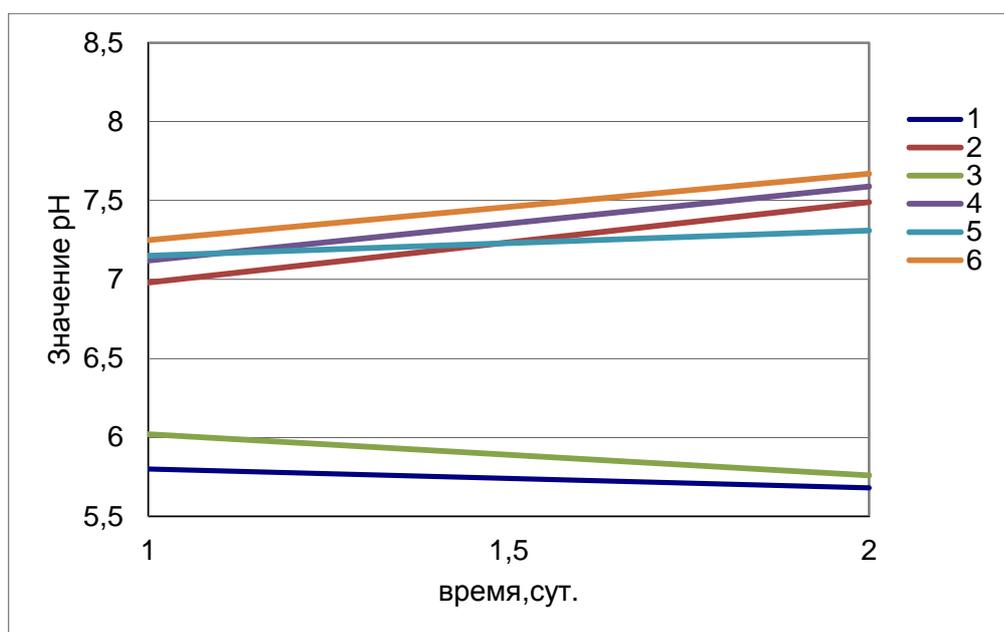


Рисунок 1. Результаты исследования липолитических свойств шести бактериальных культур, выделенных из активного ила городских очистных сооружений

Как свидетельствуют данные, представленные на рисунке, у всех штаммов микроорганизмов в процессе культивирования в бульоне Штерна наблюдалось изменение pH культуральной среды. При выращивании штаммов № 2, 4, 5 и 6 наблюдали повышение кислотности среды в течение всего срока выращивания бактерий. Штаммы № 1 и 3 в процессе культивирования в течение 2 суток снижали pH культуральной среды за счет образования альдегидов и жирных кислот в результате деструкции жиров. Наиболее высокой липолитической активностью среди бактериальных культур, выделенных из надосадочной жидкости активного ила городских очистных сооружений, обладал штамм № 1.

Культуральные и морфологические свойства наиболее активных бактерий-жиродеструкторов, выделенных из различных источников, приведены в таблице 1.

Таблица 1. Культуральные и морфологические свойства липолитических бактериальных штаммов, выделенных из различных источников

Источник выделения	Культуральные свойства				Морфологические свойства
	цвет	край	поверхность	размер, мм	
Очистные сооружения	бежевый	ровный	выпуклая, слизистая	2-3	грам(-) палочки
Мясокомбинат	светло-бежевый	ровный	гладкая, блестящая	4-5	грам (+) кокки
Кожевенный завод	молочно-белый	неровный	сухая, шероховатая	3-7	грам (+) палочки

Для выбора липолитического штамма с наибольшими ростовыми характеристиками были приготовлены жидкие питательные среды, содержащие свиной жир в концентрациях (%) 0,5;1,0; 1,5; 2,0 и минеральные соли. Стерилизацию сред проводили в автоклаве при 120 °С в течение 15 мин. С целью получения мелкодисперсной жировой эмульсии, доступной для утилизации микробной клеткой, питательные среды подвергали ультразвуковому воздействию при частоте 44 кГц и силе тока 0,54 А. Полученные среды засеивали взвесями наиболее активных липолитических микроорганизмов, выделенных из трех источников, посеивали инкубировали в течение 24 ч при температуре 27 °С. Концентрацию биомассы определяли макрокультуральным методом. Результаты экспериментов представлены в таблице 2.

Таблица 2. Определение концентрации биомассы липолитических штаммов

Источник выделения	Содержание жира, %	Концентрация биомассы, м.к./мл
очистные сооружения	0,5	$17 \cdot 10^3$
	1,0	$181 \cdot 10^3$
	1,5	$176 \cdot 10^3$
	2,0	$1 \cdot 10^3$
мясокомбинат	0,5	$7 \cdot 10^3$
	1,0	$26 \cdot 10^3$
	1,5	$10 \cdot 10^3$
	2,0	$4 \cdot 10^3$
кожевенный завод	0,5	$19 \cdot 10^3$
	1,0	$229 \cdot 10^3$
	1,5	$191 \cdot 10^3$
	2,0	$4 \cdot 10^3$

Данные, приведенные в таблице 2, свидетельствуют, что наибольший выход биомассы на селективной питательной среде с жиром дает бактериальный штамм, выделенный из сточных вод Волгоградского кожевенного завода.

С целью идентификации штамма исследовали его биохимические свойства. Выделенный микроорганизм являлся оксидазотрицательным, уреазотрицательным облигатным аэробом, на желточно-солевой среде Чистовича рос без изменения питательной среды. На кровяном агаре проявлял гемолитическую активность. Микроскопирование бактерий показало наличие спорообразования. При окраске спор по Ожешко выявлено их субтерминальное расположение. Морфологические, культуральные и биохимические свойства выделенного микроорганизма позволили отнести его к семейству Bacillaceae, роду *Bacillus*. Выделенный штамм был обозначен как *Bacillus* sp. ТУ5.

С целью увеличения скорости роста выделенных микроорганизмов было проведено клонирование, мутагенез и селекция бактериального штамма. Суточную культуру в концентрации  $10^9$  м.к. в 1 мл высевали на плотные питательные среды и подвергали мутагенезу, облучая ультрафиолетовым светом с длиной волны 260 нм в течение 8 и 12 мин. После облучения микроорганизмы инкубировали 18 ч при 27 °С. В качестве контроля использовали культуру исходного штамма, не подвергнутую воздействию мутагенного фактора. Интенсивность роста бактерий оценивали фотокolorиметрическим методом. Результаты с тремя клонами выделенного штамма представлены в таблице 3.

Таблица 3. Изучение интенсивности роста трех клонов штамма *Bacillus* sp. ТУ5 после обработки мутагенным фактором

Время облучения, мин	Номер клона	Оптическая плотность, отн. ед	% отклонения от контроля
8	1	0,203±0,015	+76,5
	2	0,270±0,020	<b>+134,8</b>
	3	0,240±0,017	+108,7
12	1	0,095±0,009	-17,4
	2	0,103±0,013	-25,4
	3	0,091±0,007	-99,2
Контроль		0,115±0,015	-

Данные, представленные в таблице 3, свидетельствуют о том, что воздействие физического мутагенного фактора (ультрафиолетового облучения) изменяло уровень накопления биомассы бактерий в жидкой питательной среде. Экспозиция в течение 8 мин приводила к увеличению концентрации клеток в суспензии. Наибольшая интенсивность роста обнаружена у клона № 2 (превышение оптической плотности суспензии по сравнению с контролем на 134 %). Ультрафиолетовое облучение культуры в течение 12 мин снижало уровень накопления биомассы по сравнению с исходной культурой. Полученный высокопродуктивный клон штамма *Bacillus* sp. ТУ5 является перспективным для дальнейших исследований с целью создания бактериального препарата, эффективно разлагающего жировые загрязнения сточной воды пищевых производств.

## **Выводы**

1. Из надосадочной жидкости активного ила городских очистных сооружений, смыва с производственного оборудования Волгоградского мясокомбината и сточной воды Волгоградского кожевенного завода выделено 30 бактериальных культур, обладающих жирорасщепляющими свойствами.
2. В результате исследования липолитической активности выделенных культур отобран наиболее активный штамм, идентифицированный как *Bacillus* sp. ТУ5.
3. В результате клонирования, мутагенеза и селекции штамма *Bacillus* sp. ТУ5 получен высокопродуктивный клон, перспективный для создания бактериального препарата-липидодеструктора.

## **Список литературы**

1. Жмаков, Г.Н. Эксплуатация оборудования и систем водоснабжения и водоотведения / Г.Н. Жмаков. – М.: Инфра-М, 2005. – 237с.
2. Кузнецов, А.Е. Прикладная экобиотехнология: учебное пособие: в 2 т. Т. 1 /А.Е. Кузнецов [ и др.]. – М.: Бином. Лаборатория знаний, 2012. – 629 с.
3. Лабинская, А.С. Микробиология с техникой микробиологических исследований. – М.: Медицина, 1978. – 394 с.
4. Форстер, К.Ф. Экологическая биотехнология: Пер. с англ. / К.Ф. Форстер, Д.А. Вейза. – Л.: Химия, 1990. – 284с.
5. Хоулт Дж. Определитель бактерий Берджи /Дж.Хоулт [ и др.]. – Т.2. – М.: Изд-во, 1997. – 368 с.

## **Рецензенты:**

Ранделин А.В., д.с-х.н., профессор, заместитель директора по научной работе Поволжского научно-исследовательского института производства и переработки мясомолочной продукции Россельхозакадемии, г. Волгоград.

Масленников А.А., д.б.н., заведующий лабораторией «Экологическая токсикология» ФГУП «НИИ гигиены токсикологии и профпатологии», г. Волгоград.