

Copyright © 2014 by Academic Publishing House *Researcher*



Published in the Russian Federation
European Journal of Molecular Biotechnology
Has been issued since 2013.

ISSN: 2310-6255

E-ISSN 2409-1332

Vol. 5, No. 3, pp. 120-130, 2014

DOI: 10.13187/ejmb.2014.5.120

www.ejournal8.com



UDC 628.543. 35: 579.22

The Research of Growth Capability Intensification and Lipolytic Activity of Fat Splitting Microbial Cultures by Influence of Natural Mineral Components

¹ Olga V. Kolotova
² Irina V. Vladimtseva
³ Svetlana N. Orlova
⁴ Irina V. Sokolova

¹⁻⁴ Volgograd State Technical University, Russian Federation
28, Lenina Avenue, Volgograd, 400131

¹ PhD (Technical), Associate Professor
E-mail: olgakolotova@mail.ru

² Dr. (Biology), Professor
E-mail: alexvlad32@yandex.ru

³ Post graduate student

⁴ PhD (Biology), Associate Professor
E-mail: mogi-irina@yandex.ru

Abstract

23 bacterial strains with lipase activity were separated from the waste water of the meat-processing enterprises and Volgograd water-handling facilities aeration tank. There were studied their morphological, cultural and biochemical properties and their animal and vegetable fat splitting ability. Comparative analysis of fat splitting ability has been carried out for searched strains and devices of enzyme activity increasing and growing process intensity of searched microorganisms were investigated. Mineral nature ingredients – the lake Elton brine, the bischofite, the Dead Sea salt – were added in the culture mediums for increasing of biomass accumulation. It has been investigated that addition of the brine into the culture medium in 5 % concentration increases the growth rate of producer lipase on 293 % in comparison with growth of the control medium without the brine. Addition of 0,25 % the Dead Sea salt concentration intensifies the growth on 317 % in comparison with the control medium. Laboratory simulation of fat waste water purification process has been realized with one of separated activity bacterial strains and it has been showed that addition of the 0,5 % bischofite into the fermenter stimulates lipase activity of the searched microorganisms.

Keywords: waste water; biological purification; fat biodegradation; lipase activity; bischofite; brine; the Dead Sea salt.

Введение

Развитие пищевых предприятий в России, повышение нагрузки на водоотводящие и очистные сооружения для промышленных и хозяйственно-бытовых стоков за последние годы, сделало особенно актуальным решение проблемы очистки сточных вод от масложировых загрязнений. Так, доля производственных сточных вод в общем объёме

стоков мясоперерабатывающего предприятия составляет 70–75 %. Из них около 50 % стоков содержат жировые загрязнения [1]. Недостаточная очистка стоков от жира приводит к «зарастанию» канализационных труб и коммуникаций, уменьшению их пропускной способности, появлению неприятных запахов вследствие гниения органических веществ, снижает эффективность работы очистных сооружений. Жиры представляют собой сложные органические вещества, зачастую поступающие в очистные сооружения в твердом состоянии и недоступные для усвоения активным илом аэротенков. Как показали исследования Московского государственного строительного университета, городские биологические очистные сооружения способны осуществлять биохимическую деструкцию жиров при совместном их присутствии в эмульгированном и растворенном виде, соответственно, в следующих концентрациях: 10 и 80 мг/л; 20 и 50 мг/л; 30 и 20 мг/л [1]. В связи с этим, сточные воды, поступающие на биологические очистные сооружения, должны иметь указанные показатели. Поэтому важнейшее значение приобретает локальная очистка стоков от масложировых примесей непосредственно на предприятиях перед сбросом их в городские коллекторы. В то же время механическое отделение твердого жира от стока значительно сокращает нагрузку на сооружения биологической очистки, но не приводит к решению проблемы утилизации жировой массы - забитые жиром колодцы, жиросборники требуют периодической откачки собранного жира и его переработки. Особенно серьезной проблемой является обработка осадков из отстойников – жиромассы и донных осадков [1]. Необходима разработка эффективных методов не только очистки сточной воды от жиров, но и утилизации и обезвреживания отделяемой от воды жировой массы.

Одним из перспективных способов решения указанных проблем является биоферментная технология разложения жировых загрязнений. Биоферментные технологии по разложению и утилизации жиров в сточных водах основаны на использовании микробных липаз и микроорганизмов, способных к их продуцированию. В настоящее время применение биопрепаратов, содержащих комплекс специально подобранных активных микроорганизмов-деструкторов, для очистки сточных вод становится все более масштабным. Однако, на рынке Российской Федерации представлены лишь несколько препаратов, в основном зарубежного происхождения [2]. Ассоциации микроорганизмов (грибов и бактерий), входящих в состав подобных биопрепаратов разлагают углеводороды, жиры, белки и углеводы, снижая ХПК и БПК воды, удаляют неприятные запахи, устраняют засоры в жиросборниках, поддерживая их длительное время в рабочем состоянии. Ферментные системы абсолютно безопасны для коммуникаций, арматуры, пластмассовых деталей, прокладок, не разрушают трубы. При регулярном и правильном применении они существенно продлевают срок эксплуатации системы сточной канализации. Использование биопрепаратов не требует применения дорогостоящего оборудования, отмечается сокращение объемов жировых отходов, образующихся при эксплуатации жиросборников. Предприятиям, не имеющим очистных сооружений и сбрасывающим сточные воды в централизованную систему канализации, улучшение их качества позволяет уменьшить размеры штрафов [1].

Экспериментальные исследования свидетельствуют о том, что микробные липазы являются ферментами с широкой специфичностью и большим разнообразием свойств. Свойства липаз и характер липолитической активности даже у одного рода могут значительно варьировать. Изучение микробных липаз представляет большой теоретический и практический интерес, так как они могут быть использованы при гидролизе разнообразных жировых субстратов [3]. Липазы катализируют гидролиз жиров и масел с образованием диацилглицеридов, моноацилглицеридов, глицерина и жирной кислоты. Катаболизм включает три основных фазы превращения органических веществ органотрофами. В первой фазе с помощью экзоферментов бактерии гидролизуют липиды до жирных кислот и глицерина, которые могут легко транспортироваться в цитоплазму. Во второй фазе поступившие в цитоплазму органические вещества расщепляются до фрагментов, содержащих два-три углеродных атома. В третьей фазе эти соединения окисляются до углекислого газа и воды. [4]. Липазы можно разделить на две группы: специфичные и неспецифичные. Ферменты из первой группы гидролизуют сложноэфирные связи в первом или втором положении. Многие микробные липазы обычно гидролизуют первичные сложноэфирные связи (α -эфирные связи). В гидролизатах с участием таких

ферментов обычно обнаруживаются жирные кислоты, 2,3- и 1,2-диглицериды, 2-моноглицериды. При более длительных гидролизах жирнокислотный остаток из 2-моноглицерида мигрирует в первое положение с образованием 1-моноглицерида, который легко гидролизует специфичной липазой с образованием глицерина и жирной кислоты. К этой группе относятся липазы из *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus delemar*, *Rhizopus microsporus*, *Mucor miechei*, *Aspergillus niger*, *Pseudomonas sp.* и т.д.

Липазы второй группы не различают эфирные связи во всех трех положениях триглицеридной молекулы и способны подвергать субстрат тотальному гидролизу. В гидролизатах триглицеридов с участием этих видов липаз обнаруживаются, как правило, остатки триглицеридов (негидролизованная часть), глицерин и жирные кислоты. Такие липазы были выделены из *Geotrichum candidum*, *Oospora lactis*, *Humicola lanuginosa* и т. д. Активность липаз зависит от длины цепочки и степени насыщенности жирной кислоты. Дженсон описал, что липаза *Geotrichum candidum* проявляла высокую специфичность к олеиновой и линолевой кислотам независимо от их положения в молекулах триглицеридов. Такими же свойствами обладают липазы из *Achromobacter lipolyticum*, тогда как липаза из *Aspergillus niger* проявляла большую специфичность к стеариновой кислоте и молекулам субстратов. [5]. Установлено также, что жирные кислоты, образующиеся в результате ферментативного гидролиза с участием *Alcaligenes faecalis* и *Bacillus licheniformis*, выделенных из сточных вод после процесса эмульсионного обезжиривания овчинно-шубного сырья, в дальнейшем вовлекаются в цикл трикарбоновых кислот и последующая их деструкция сопровождается уменьшением длины углеводородной цепочки и образованием более сильных кислот [6], [7].

Российскими учёными активно развивается данное направление исследований. Так, в работе [8] проведена сравнительная оценка 7 микроорганизмов: бактерий (*Bacillus mesentericus*, *B. subtilis*, *Acinetobacter sp.*), грибов (*Aspergillus oryzae*, *Penicillium oryzae*), дрожжей (*Candida scottii*, *Yarrowia lipolytica*), по показателям липолитической активности, содержанию клеточного белка и характеристикам роста на жиросодержащих питательных средах. Установлено, что дрожжи *Y. lipolytica*, обладающие лучшими ростовыми характеристиками, способны ассимилировать до 95 % жировых отходов от их общего содержания в среде, а образующаяся биомасса содержит не менее 42 % истинного белка. Кроме того, автором показано, что введение в питательную среду ионов калия и кальция оказывают стимулирующее действие на экзолипазу дрожжей, что позволяет повысить липолитическую активность на 4-5 %, а добавление перекиси водорода в концентрации 2,5 г/л к посевному материалу значительно ускорял процесс биоконверсии жировых отходов.

Современные биопрепараты для очистки сточных вод – это консорциумы микроорганизмов, выделенные методом накопительных культур обычно из активного ила аэротенков локальных или городских сооружений очистки сточных вод. Биопрепараты, содержащие ограниченное число видов микроорганизмов, по спектру разлагаемых веществ уступают свежему активному илу. Однако они содержат быстро растущие штаммы, которые инициируют процессы разложения органических загрязнений. В нестерильном процессе развиваются также микроорганизмы, содержащиеся в отходах, и в микробное сообщество включаются недостающие звенья [9].

Так, в работе [10] из образцов активного ила очистных сооружений мясокомбината выделена и идентифицирована группа новых штаммов бактерий рода *Serratia*, проявляющих высокую липолитическую активность. Автором установлено, что исследуемые микроорганизмы способны осуществлять 100% биodeградацию жиров растительного и животного происхождения. Показано также, что введение в питательную среду для культивирования липолитически активных микроорганизмов оптимальных концентраций соевой муки и автолизата дрожжей повышает липазную активность в 10–16 раз, а полная деструкция жировых загрязнений осуществляется за 96 ч. культивирования. Наиболее активный из изученных штаммов *Serratia marcescens* запатентован в качестве основы биопрепарата для очистки жиросодержащих сточных вод [11].

ООО «РСЭ-трейдинг» (г. Москва) разработан биопрепарат для очистки водоотводящих коммуникаций от жировых загрязнений, а также утилизации жиров, скопившихся в жиरोуловителях [12]. Биопрепарат Микрозим™ Гриз Трит производится промышленными

партиями в виде сухого спорового порошка на экологически чистом питающем носителе из кукурузной муки. Этот порошок и вносится в жируловитель. Для удобства препарат можно вносить также через мойки и трапы. Биодеструктор жиров Микрозим™ Гриз Трит содержит от семи до 12 уникальных видов живых спорообразующих микроорганизмов, способных усваивать жиры, белки, углеводы и полисахариды и образовывать в качестве конечных продуктов воду, углекислый газ и легкий донный осадок. Препарат имеет рабочий диапазон рН от 4,25 до 10, диапазон рабочих температур 5...50 °С (оптимально 10...40 °С), одинаково эффективно действует как в анаэробных, так и в аэробных условиях.

Таким образом, биопрепараты, содержащие культуры липидорасщепляющих микроорганизмов могут найти широкое применение, как в бытовых условиях, так и в промышленности при локальной очистке сточных вод, содержащих разнообразные отходы жировой природы. Следовательно, поиск новых активных штаммов микроорганизмов, быстро и эффективно разлагающих различные жировые субстраты, в широких диапазонах температур, в условиях меняющегося химического состава сточных вод является весьма актуальной задачей.

Целью данной работы было выделение и изучение основных свойств микроорганизмов, способных утилизировать липиды, а также исследование возможности увеличения скорости роста липазопродукторов под влиянием природных минеральных веществ.

Материалы и методы исследования

Липидорасщепляющие микроорганизмы выделяли из надосадочной жидкости активного ила городских очистных сооружений и смывов с технологического оборудования Волгоградского мясокомбината. Выделение жирорасщепляющих бактериальных штаммов производили на селективных плотных питательных средах, содержащих в качестве единственного источника углерода свиной или говяжий жир, а также минеральные соли [12].

Методика выделения микроорганизмов заключалась в высеве проб сточной воды и надосадочной жидкости активного ила в объеме 1 мл на приготовленные селективные среды. Посевы инкубировали в течение 24 ч при 27°C и 48 ч при комнатной температуре (18°C), 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 10⁹ микробных клеток (м.к.) в 1 мл, которые были десятикратно разведены в физиологическом растворе и посеяны на пластинки питательного агара в чашки Петри для получения изолированных колоний. Культуральные 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 подтверждали выращиванием на среде, содержащей твин 80 (полиоксиэтилен сорбитан моноолеат), и 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 10⁹ м.к. в 1 мл. Пробирки с микроорганизмами термостатировали при температуре 27°C в течение 120 ч и проводили наблюдение за изменением рН бульона Штерна с помощью рН-метра (рН/ORP Meter HI 2215). В качестве контрольного варианта использовали бульон Штерна без внесения в него микроорганизмов.

Для изучения влияния природных минеральных материалов на интенсивность роста и накопления биомассы готовили питательные среды, содержащие в качестве источников углерода и азота 2% глюкозы и 2% нитрата аммония, соответственно, а также различные

концентрации рапы оз. Эльтон, бишофита Волгоградского месторождения и солей Мёртвого моря (Израиль). Среды автоклавировали при 0,5 атм. в течение 20 мин. Для оценки влияния минеральных добавок на интенсивность роста липазопродуцентов пользовались фотоколориметрическим методом, сравнивая оптические плотности суточных суспензий микроорганизмов в экспериментальных и контрольной средах на приборе КФК-2-УХЛ-4.2 при длине волны светофильтра 670 нм в кюветках с длиной оптического пути 5,065 мм. В качестве контрольной использовали питательную среду, содержащую только глюкозу и нитрат аммония.

Рапа озера Эльтон (Волгоградская область) относится к бромным крепким рассолам хлоридного и магниевно-натриевого состава. В рапе преобладают галит – около 56 %, бишофит – около 29 %, содержатся также кизерит, карналлит и др. соли [13]. Из катионов в рапе содержатся: литий, аммоний, калий, натрий, магний, кальций. Из анионов присутствуют хлорид, бромид, сульфат, гидрокарбонат. Реакция среды рапы нейтральная (рН=7,1).

Волгоградский природный бишофит представляет собой спрессованный под высоким давлением вышележащих слоев камень. По химико-минеральному составу – это комплекс солей и микроэлементов (Табл. 1) [14].

Таблица 1

Химический состав Волгоградского природного бишофита

Наименование вещества	Химическая формула	Содержание, %масс.
Хлористый магний	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	90-96
Хлористый калий-магний	$KCl \cdot MgCl_2 \cdot 6H_2O$	0,1-5,5
Сернокислый магний	$MgSO_4 \cdot 6H_2O$	0,1-2,5
Бромистый магний	$MgBr_2$	0,4-0,95
Сернокислый кальций	$CaSO_4 \cdot 2H_2O$	0,1-0,7
Хлористый натрий	$NaCl$	0,1-0,4
Бор	B	0,002-0,08
Кальций	Ca	0,003-0,005
Висмут	Bi	0,0005-0,001
Молибден	Mo	0,005-0,001
Железо	Fe	0,003-0,005
Алюминий	Al	0,001-0,02
Титан	Ti	0,005-0,001
Медь	Cu	0,0001-0,003
Кремний	Si	0,02-0,2
Барий	Ba	0,0001-0,0006
Стронций	Sr	0,001-0,02
Рубидий	Rb	0,0001-0,002
Цезий	Cs	0,0001-0,001
Литий и др.	Li	0,0001-0,0003

Соли Мертвого моря добываются на северо-западной части акватории Мертвого моря, вблизи курорта Калья, государство Израиль. Соль получают из воды Мертвого моря путем выпаривания. Химический состав соли Мертвого моря включает 26 минералов и микроэлементов: NaCl 14–16 %, KCl 18–22%, $MgCl_2$ 25–31 %, $CaCl_2$ 0,5–1 %, бромиды 0,2–0,3 %, кристаллизационная вода 26–32 %, нерастворимые компоненты (железо, фтор) 0,2 % и такие микроэлементы, как медь, цинк, кобальт (их содержание менее 1 мг/кг).

Для глубинного культивирования липолитически активного бактериального штамма использовали лабораторный ферментёр марки LKB BIOTEK POLYFERM 1607 ёмкостью 1 л, куда вносили 150 мл питательной среды (контрольной или содержащей бишофит), 1,5 мл оливкового масла (1 % от объёма среды) и 5 мл бактериальной взвеси из суточной культуры, приготовленной по стандарту мутности на 10 единиц. Все компоненты заранее стерилизовали в автоклаве при 0,5 атм. Культивирование проводили в течение 3 суток при 20°C, постоянных аэрации и перемешивании. В ходе эксперимента ежедневно осуществляли

мониторинг рН культуральной жидкости, отбирая пробы и определяя величину водородного показателя.

Результаты и обсуждение

В результате первичного анализа культуральных и морфологических свойств микроорганизмов, выросших на экспериментальных селективных средах, было выделено 23 бактериальные культуры: 6 штаммов – из надосадочной жидкости активного ила городских очистных сооружений и 17 культур – из смыва с производственного оборудования Волгоградского мясокомбината. Из выделенных культур были отобраны штаммы, характеризующиеся максимальными скоростями роста на селективных средах при комнатной температуре, и изучена их липолитическая активность с использованием бульона Штерна. При культивировании изучаемых микроорганизмов в бульоне Штерна наблюдали изменение цвета культуральной жидкости и фиксировали изменение активной реакции среды. Полученные данные сведены в таблицу 2.

Таблица 2

Изменение рН культуральной жидкости при культивировании в бульоне Штерна микроорганизмов, выделенных на селективных жиродержащих средах

Источник	№ штамма	Изменение рН	
		24 ч	48
Мясокомбинат	2	7,04	7,00
	4	7,04	7,06
	6	5,25	5,12
	8	7,07	7,15
	16	7,49	7,83
	17	7,21	7,28
	Активный ил	1	5,82
	2	6,98	7,49
	3	6,02	5,76
	4	7,12	7,59
	5	7,15	7,31
	6	7,25	7,67

Как свидетельствуют данные, представленные в таблице 2, у всех штаммов микроорганизмов в процессе культивирования в бульоне Штерна наблюдалось изменение рН культуральной среды. При выращивании штаммов № 4, 8, 16, 17, выделенных из смывов на мясокомбинате и штаммов № 2, 4, 5, 6, выделенных из активного ила, наблюдали повышение кислотности среды в течение всего времени выращивания бактерий. Штаммы № 2, 6 (мясокомбинат) и № 1 и 3 (активный ил) в процессе культивирования в течение 2 суток снижали рН культуральной среды за счет образования жирных кислот и альдегидов в результате деструкции жиров. Полученные данные позволили выбрать наиболее активные деструкторы жира в каждом из источников выделения. Наиболее высокой липолитической активностью обладают штамм № 6, выделенный из смывов с оборудования мясокомбината, и штамм № 1, полученный из надосадочной жидкости активного ила городских очистных сооружений.

Культуральные и морфологические свойства наиболее активных бактерий-жиродеструкторов приведены в таблице 3.

Таблица 3

Культуральные и морфологические свойства липолитически активных бактериальных штаммов

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 (+) короткие палочки

Для выбора липазопродуцента 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 липолитически активных микроорганизмов, посева инкубировали в течение 24 ч при температуре 27 °С. Концентрацию биомассы определяли макрокультуральным методом. Результаты экспериментов представлены в таблице 4.

Таблица 4

Определение концентрации биомассы липолитических штаммов

Источник выделения	Содержание жира, %	Концентрация биомассы, м.к./мл
очистные сооружения	0,5	17·10 ³
	1,0	181·10 ³
	1,5	176·10 ³
	2,0	1·10 ³
мясокомбинат	0,5	7·10 ³
	1,0	26·10 ³
	1,5	10·10 ³
	2,0	4·10 ³

Данные, приведенные в таблице 4, свидетельствуют, что наибольший выход биомассы на селективной питательной среде, содержащей эмульгированный свиной жир, дает бактериальный штамм, выделенный из надосадочной жидкости аэротенка городских очистных сооружений Волгограда.

В ходе дальнейших исследований для изучения возможности интенсификации роста полученных бактериальных штаммов и повышения их липазной активности изучали влияние природных минеральных веществ на скорость роста и накопления биомассы штамма № 6, выделенного из смывов с технологического оборудования Волгоградского мясокомбината. Ранее нами были получены данные о стимулирующем влиянии бишофита и рапы оз. Эльтон на ростовые процессы ассоциации микроорганизмов активного ила городских очистных сооружений [14, 16]. Для решения поставленной задачи микроорганизмы культивировали на питательных средах, содержащих различные концентрации рапы оз. Эльтон, солей Мертвого моря и бишофита. Интенсивность накопления бактериальной массы в средах с различными концентрациями минеральных добавок сравнивали с интенсивностью накопления биомассы в контрольных питательных

средах фотокolorиметрическим методом, рассчитывая коэффициент прироста биомассы по формуле:

$$K = \frac{D_{оп.}}{D_{контр.}} \cdot 100\%,$$

где $D_{оп.}$ – оптическая плотность суточной суспензии бактериальных клеток в среде с минеральной добавкой, усл. ед.; $D_{контр.}$ – оптическая плотность суточной суспензии бактериальных клеток в контрольной среде, усл. ед.

Полученные данные в виде графических зависимостей коэффициента прироста биомассы микроорганизмов (K) от концентрации минеральной добавки в питательной среде приведены ниже на рисунке.

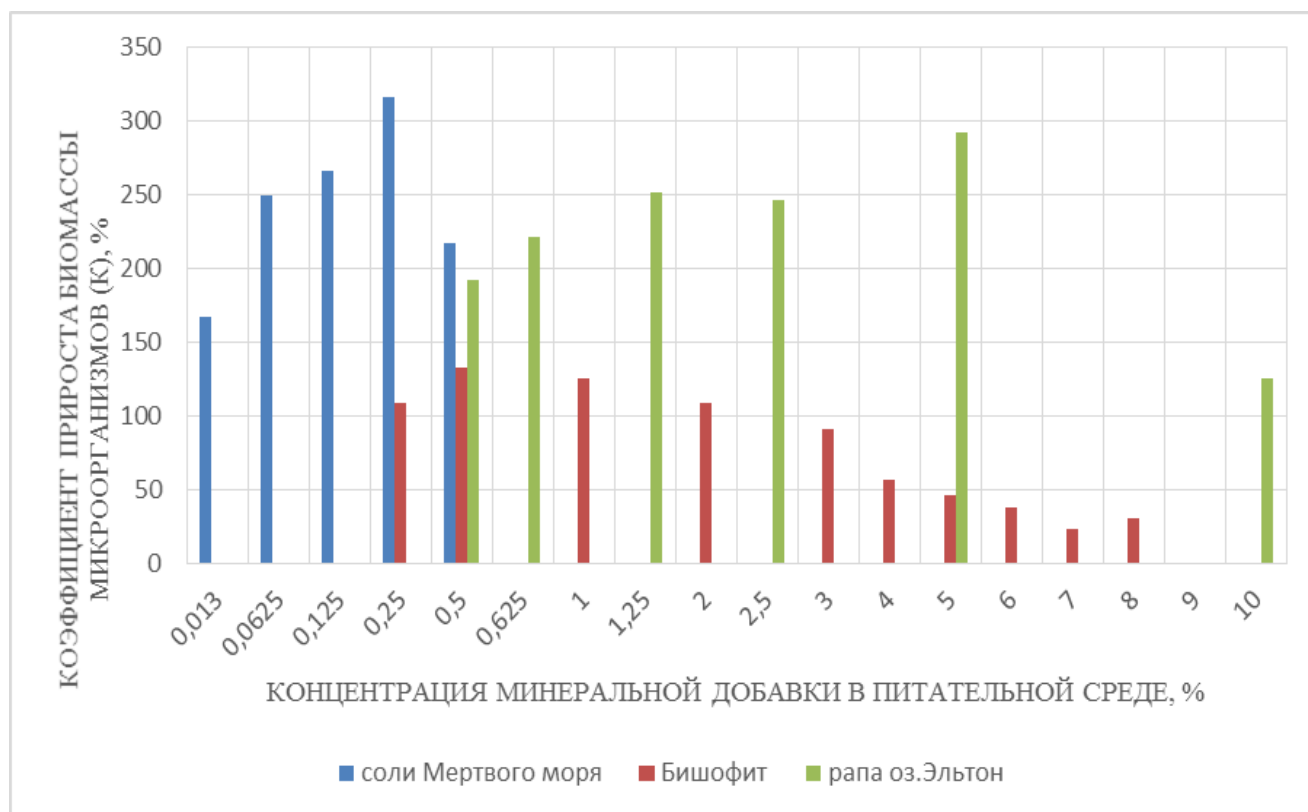


Рисунок. Зависимость коэффициента прироста биомассы липолитически активного бактериального штамма, выделенного из смывов мяскокомбината, от концентрации минеральных добавок в питательных средах

Анализ полученных зависимостей показывает, что максимальный прирост биомассы изучаемых микроорганизмов наблюдается при введении в питательную среду солей Мёртвого моря в концентрации 0,25 % (вес.). В этих условиях коэффициент прироста бактериальной массы, по сравнению с контрольной средой, составляет 317 %. Введение в культуральную жидкость рапы озера Эльтон обеспечивает максимальный прирост биомассы (293 %) при концентрации рапы 5 % (вес.), а оптимальная концентрация бишофита составляет 0,5 % (об.), обеспечивая прирост бактериальной массы 133 % по сравнению с контрольной средой. Таким образом, все исследуемые природные минеральные вещества перспективны в качестве минеральных добавок к питательным средам для культивирования липидорасщепляющих бактерий. Однако рапа оз. Эльтон и бишофит существенно доступнее (оба ресурса добываются в Волгоградской области), чем соли Мёртвого моря.

На следующем этапе исследований была изучена возможность повышения липолитической активности штамма № 6 при глубинном культивировании бактерий на среде, содержащей оливковое масло в качестве единственного источника углерода, в присутствии оптимальной концентрации бишофита, установленной в ходе

предварительного эксперимента. Для оценки липолитической активности в ходе трёхсуточного культивирования микроорганизмов ежедневно производили измерения pH культуральной жидкости. Снижение величины водородного показателя свидетельствует о накоплении в среде культивирования жирных кислот, снижающих величину pH. Результаты, полученные в ходе данного эксперимента, сведены в таблицу 5.

Таблица 5

Изменение активной реакции культуральной жидкости в ходе культивирования липидорасщепляющих микроорганизмов на экспериментальной и контрольной средах

Время культивирования, ч	pH экспериментальной среды	pH контрольной среды
0	6,46	6,31
24	5,08	5,83
48	5,01	5,70
72	4,89	5,70

Приведенные в таблице 5 данные свидетельствуют о том, что при культивировании исследуемого микроорганизма на питательной среде, содержащей 0,5 % (об.) бишофита, в первые сутки pH культуральной жидкости снижается на 1,34 единицы, в то время как изменение pH контрольной среды составило 0,48 единиц. Полученные данные доказывают стимулирующее действие бишофита на липолитическую активность исследуемого бактериального штамма. Это подтверждается также дальнейшим (в течение 72 ч.), хотя и не таким значительным, как в первые 24 ч., снижением pH культуральной жидкости при выращивании исследуемых микроорганизмов на питательной среде с добавлением бишофита.

Таким образом, в ходе проведенных исследований доказан стимулирующий эффект, который оказывают природные минеральные вещества – рапа озера Эльтон, соли Мёртвого моря и бишофит – на скорость роста и накопления биомассы липидорасщепляющих бактерий, а также на их липолитическую активность при глубинном культивировании и оптимальном содержании бишофита в питательной среде. Выделенные бактериальные культуры являются перспективными для дальнейших исследований с целью создания бактериального препарата, эффективно разлагающего различные жировые загрязнения сточных вод. А природные минеральные вещества могут стать ценными компонентами готовых форм подобных бактериальных препаратов.

Заключение

Из надосадочной жидкости активного ила городских очистных сооружений и смыва с производственного оборудования Волгоградского мясокомбината выделены 23 бактериальные культуры, обладающие липидорасщепляющими свойствами. В результате исследования липолитической активности выделенных культур отобраны наиболее активные штаммы, изучены их культуральные и морфологические свойства. Изучено влияние добавок рапы озера Эльтон, солей Мёртвого моря, бишофита Волгоградского месторождения на скорость роста и накопления биомассы наиболее активных липидорасщепляющих штаммов. В ходе исследования были определены оптимальные концентрации природных минеральных веществ, стимулирующие рост изучаемых бактерий. Установлено, что введение в культуральную жидкость бишофита в концентрации 0,5 % (об.) при глубинном выращивании микроорганизмов существенно стимулирует липолитическую

активность бактериального штамма, выделенного из смывов с производственного оборудования мясокомбината.

Примечания:

1. Belousova, N.I., Manuilova, T.D. Sposoby i sredstva ochistki zhirosoderzhashchikh stochnykh vod// Myasnaya industriya. 2007. №7, p. 57-60.
2. Poskryakova N.V. Razrabotka osnovy biopreparata dlya destruktсии zhirov: aftoref. dis... kand. biol. nauk: Ufa, 2007. 24 s.
3. Ruban, E.L. Mikrobnnye lipidy i lipazy/ E.L. Ruban. Moskva: Nauka, 1977, 216 s.
4. Grinevich, A.G. Tekhnicheskaya mikrobiologiya/ A.G. Grinevich, A.M. Bosenko. – Minsk: Vyssh. Shk., 1986, 168 p.
5. Brokerkhof, K. Lipoliticheskie fermenty/ K. Brokerkhof, R. Djensen, per. s angl. T.P.Levchuck [I dr.], pod red. A.E. Braunshteina [I dr.].- Moskva: Mir, 1978, 396 p.
6. Shalbuev, D.V. Izuchenie destruktсии zhirov metodom potentsiometricheskogo titrovaniya/ D.V. Shalbuev, M.V. Slavgorodskaya, N.V. Syachinova// Vestnik VSGTU. Ulan-Ude. 2009. №1 (24). P.59-65.
7. Shalbuev, D.V. Vliyanie soderzhaniya organicheskikh veshchestv na stepen' ikh utilizatsii mikroorganizmami/ D.V. Shalbuev, M.V. Slavgorodskaya, N.V. Syachinova // Ecologiya i promyshlennost' Rossii. 2010. №3.P. 44-47.
8. Suyasov N.A. Ispol'zovanie zhirovyykh otkhodov myasopererabotki v kachestve syr'ya dlya polucheniya belkovoi kormovoi dobavki: aftoref. dis... kand. tekhn. nauk. M., 2007. 18 s.
9. Bender, M. Bioorganicheskaya khimiya fermentativnogo kataliza / M.Bender, R. Bergeron, M. Komiyama/ Moskva: Mir, 1987. 352 p.
10. Silishchev N.N. Mikrobiologicheskie tekhnologii v protsessakh remediatsii prirodnykh i tekhnogennykh ob'ektov: aftoref. diss... d. biol. nauk. Ufa, 2009. 47 s.
11. Patent RF 2006107802/13, 13.03.2006. Loginov O.N., Pakaneshchikova N.V., Silishchev N.N., Galimzyanova N.F., Boiko T.F. Shtamm bakterii Serratia Marcescens, produciruyushchii fermenty, dlya polucheniya preparata dlya ochistki stochnykh vod ot zhirov//Patent Rossii №2310685. 2007. Bul. № 6.
12. Utilizatsiya zhirovoi massy s ispol'zovaniem nanotekhnologii// Rybprom. 2009, №1 p. 38-39.
13. Orlova, S.N. Vydelenie i izuchenie osnovnykh svoystv lipidookislyayushchikh mikroorganizmov/ S.N. Orlova, N.V. German, I.V. Vladimtseva, O.V. Kolotova, I.V. Boikova// Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya. 2014. №3; URL: <http://www.science-education.ru/117-13111>. (data obrashcheniya 03.07.2014)
14. Kolotova, O.V. Ispol'zovanie prirodnykh neorganicheskikh veshchestv dlya intensivatsii biotekhnologicheskikh protsessov/ O.V. Kolotova, I.V. Vladimtseva, N.V. German, I.V. Sokolova// Vestnik Kazanskogo tekhnologicheskogo universiteta. 2013. Vol.16, № 23. P.132-135
15. Anuchkin, S.A. Perspektivy osvoeniya i pererabotki bishofita Volgogradskikh mestorozhdenii/ T.K. Anuchkin, S.A. Anan'ina, I.I. Nikitin// Volgograd. – Volgogradskaya gosudarstvennaya arkhitekturno-stroitel'naya akademiya. 1995. 116p.
16. Kolotova. O. V. Primenenie prirodnykh neorganicheskikh veshchestv dlya intensivatsii biotekhnologicheskikh processov/ O.V. Kolotova, I.V. Vladimtseva, A.S. Red'ko, M.P. Chernobrovkina // Izv. Tul'skogo Gos. Un-ta. Estestvennye i tekhnicheskie nauki. Seriya: Nauki o Zemle. 2007. №2. P.234-238

УДК 628.543. 35: 579.22

Исследование возможности интенсификации роста и липолитической активности липидорасщепляющих микробных культур под влиянием природных неорганических веществ

¹Ольга Владимировна Колотова

²Ирина Владимировна Владимцева

³ Светлана Николаевна Орлова
⁴ Ирина Владимировна Соколова

¹⁻⁴ Волгоградский государственный технический университет, Российская Федерация
400131, Волгоград, пр. Ленина, 28

¹ Кандидат технических наук, доцент
E-mail: olgakolotova@mail.ru

² доктор биологических наук, профессор
E-mail: alexvlad32@yandex.ru

³ аспирант

⁴ кандидат биологических наук, доцент
E-mail: mogi-irina@yandex.ru

Аннотация. Из сточных вод мясокомбината и аэротенка городских водоочистных сооружений выделено 23 бактериальные культуры, обладающие липазной активностью. Изучены их морфологические, культуральные, биохимические свойства, в том числе способность расщеплять животные жиры и растительные масла. Проведен сравнительный анализ способности выделенных бактерий разлагать жировые загрязнения сточных вод и изучены способы увеличения ферментативной активности и интенсивности ростовых процессов исследуемых микроорганизмов. Для повышения скорости накопления биомассы липазопродукторов в питательные среды вводили добавки природных минеральных веществ (рапы оз. Эльтон, бишофита, солей Мёртвого моря). В ходе исследований установлено, что введение в питательную среду 0,5 % рапы озера Эльтон способствует повышению скорости роста липазопродуктора на 293 % по сравнению с ростом в контрольной среде, не содержащей рапы, а добавление 0,25 % солей Мёртвого моря интенсифицирует рост на 317 % по сравнению с контролем. Осуществлено лабораторное моделирование процесса очистки маслосодержащей воды с помощью одного из выделенных бактериальных штаммов и показано, что введение в ферментёр бишофита в концентрации 0,5 % (об.) стимулирует липазную активность исследуемых микроорганизмов.

Ключевые слова: сточные воды; биологическая очистка; биodeградация жиров; липазная активность; бишофит; рапа; соли Мертвого моря.