

УДК 579.695

ИЗУЧЕНИЕ СПОСОБНОСТИ АКТИНОМИЦЕТОВ К БИОДЕГРАДАЦИИ ТРУДНОРАЗЛАГАЕМЫХ БЕЛКОВ В СТОЧНЫХ ВОДАХ МЯСОКОМБИНАТОВ

© Л.В. Брындина, О.С. Корнеева, К.К. Полянский

Ключевые слова: биофлокуляция; мясная промышленность; очистка стоков.

Исследована возможность актиномицетов очищать сточные воды мясокомбинатов. Установлено, что уровень флокулирующего эффекта зависит от протеолитической активности: чем она выше, тем выше эффект. Наибольший флокулирующий эффект $D = 1,22$ показал *Str. chromogenes subsp. graecus* 0832. Предлагаемый в качестве биофлокулянта микроорганизм проявляет высокую специфичность к белку кератину.

В повышении эффективности биологического способа очистки сточных вод значительную роль играет определение основных видов микроорганизмов, участвующих в процессе очистки, создание оптимальных условий для их деятельности. Управлять этими процессами можно, непосредственно затрагивая тонкие механизмы физиологии и биохимии микроорганизмов. Развитие этого направления дает возможность рационально и научнообоснованно регулировать активность микрофлоры и интенсифицировать процесс биологической очистки сточных вод.

В связи с необходимостью разработки эффективной технологии очистки промышленных сточных вод внимание исследователей все больше привлекают поиски возможности использования чистых культур микроорганизмов, способных трансформировать трудноразлагаемые органические соединения. Достоинство чистых культур специфических деструкторов еще и в том, что они могут быть использованы в иммобилизованном виде на адсорбентах и биофильтрах для предотвращения отравления активного ила при залповых сбросах и при введении в строй новых технологических схем, когда состав сточных вод резко меняется.

В отработанных технологических жидкостях мясокомбинатов содержится большое количество фибриллярных белков (коллаген, кератин и др.), которые отличаются низкой функциональностью: нерастворимы в воде, имеют небольшую влагоудерживающую способность, очень высокую механическую прочность. Эта особенность объясняется наличием большого числа поперечных дисульфидных связей между полипептидными цепями в структуре таких белков. В связи с этим при выборе микроорганизма-деструктора фибриллярных белков руководствовались наличием у него протеолитической активности, в т. ч. кератиназной (последняя необходима для гидролиза белков кератинов, которые практически не разрушаются в обычных условиях) [1].

Целью исследования было выявление активного продуцента кератинасщепляющей протеиназы. Были проверены некоторые актиномицеты различных таксономических групп. У 50 штаммов микроорганизмов, взятых для исследования, одновременно определяли протеолитическую активность (ПА) и кератиназную

активность (КА). Протеолитическую активность определяли по ГОСТ 20264.2-88 [2]. Определение кератиназной активности проводили по Кашкину [3–4]. Поверхностные культуры сравниваемых микроорганизмов поддерживали на средах, рекомендованных Всероссийской коллекцией промышленных микроорганизмов (ВКПМ), научно-исследовательским институтом антибиотиков и ферментов (г. С.-Петербург ВНИТИАФ). Культуры выращивали в термостате при 30 °С в течение 12 суток. В качестве посевного материала использовали 48-часовую культуру, выращенную на среде (г/дм³): картофельный крахмал – 20; соевая мука – 20; (NH₄)₂SO₄ – 3,0; CaCO₃ – 3,0; KH₂PO₄ – 0,5; NaCl – 2,5; pH среды 6,65. Культивирование проводили в глубинных условиях в колбах объемом 750 см³, содержащих 100 см³ среды, при 28–30 °С на качалке (220–240 об./мин.). Основную питательную среду состава (г/дм³): картофельный крахмал – 40; соевая мука – 10; измельченное перо – 5; (NH₄)₂SO₄ – 0,65; KH₂PO₄ – 0,45; FeSO₄ – 0,01; ZnSO₄ – 0,02; MnCl₂ – 0,01; CaCO₃ – 3,0 засевали 5 % по объему посевного материала и выращивали на качалке 120 часов при pH среды 6,80. Культуральную жидкость актиномицетов вносили в количестве 3 % к объему сточной воды, перемешивали в течение 15 минут, отстаивали в течение часа. После чего определяли флокулирующий эффект (D). Данные по выбору продуцента кератинасщепляющей протеиназы представлены в табл. 1.

Результаты, представленные в табл. 1, показывают, что у 48 штаммов актиномицетов из 50 проявлялась протеолитическая активность в той или иной степени, при этом кератиназную активность показали 30 штаммов из 50. Следует отметить, что между значениями ПА и КА нет корреляционной зависимости. Видимо, способность к продуцированию кератинасщепляющих протеиназ является специфической особенностью отдельных представителей актиномицетов. Так, 7 штаммов проявляли высокую ПА при полном отсутствии КА.

Однако флокулирующий эффект зависит от значений ПА и КА. Наилучшие показатели соответствовали наибольшим значениям ПА и КА. При этом не было установлено прямой зависимости флокулирующего

Таблица 1

Сравнительная характеристика биосинтетической способности некоторых актиномицетов

№ п/п	Наименование культуры	ПА, ед./см ³	КА, ед./см ³	Флокулирующий эффект (Д)
1	<i>Str. chromogenes subsp.graecus</i> 0832	2,204	3,000	1,22
2	<i>Str. californicus</i> 1015	0,133	2,600	0,98
3	<i>Str. flavovariabilis</i> ВКМ Ас-141	0,187	2,100	0,72
4	<i>Str. diastatochromogenes</i> ВНИИА 1350	0,044	2,100	0,64
5	<i>Str. kurssanovii</i> ВКМ Ас-715	0,036	1,600	0,57
6	<i>Str. sp. (S. scabies)</i> ВКМ Ас-841	0,213	1,200	0,51
7	<i>Str. fradiroseus</i> ВКМ Ас-155	0,217	0,800	0,49
8	<i>Str. fradiae</i> ЛИАИ 0050	0,024	0,713	0,45
9	<i>Str. autotrophica</i> ВКМ Ас-759	0,720	0,600	0,54
10	<i>Str. viridochromogenes</i> 58	0,036	0,600	0,33
11	<i>Str. fradiae</i> ВКМ Ас-764	0,020	0,500	0,33
12	<i>Str. bikiniensis</i> ВКМ Ас-999	1,040	0,100	0,50
13	<i>Str. viridochromogenes</i> ЛИАИ 0038	0,383	0,100	0,38
14	<i>Str. chromofuscus</i> 6050	0,250	0,084	0,35
15	<i>Str. hygrosopicus</i> ЛИАИ 0374	0,784	0,060	0,42
16	<i>Str. vulvoviridis</i> ВКМ Ас-161	0,173	0,060	0,35
17	<i>Str. olivoviridis</i> ВНИИА 1258	0,089	0,050	0,20
18	<i>Str. firidochromogenes</i> ВКМ Ас-629	2,500	0,040	0,88
19	<i>Str. hugrosopicus</i> ВКМ Ас-831	0,175	0,040	0,35
20	<i>Str. sporotumulus</i> ВКМ Ас-320	0,126	0,030	0,30
21	<i>Str. fradiorectus</i> ВКМ Ас-154	0,078	0,030	0,25
22	<i>Str. sp. (S. sporocanensis)</i> ВКМ Ас-310	0,030	0,030	0,18
23	<i>Str. achromogenes</i> 391	0,251	0,027	0,36
24	<i>Str. albus</i> ЛИАИ 0012	0,047	0,025	0,20
25	<i>Str. pseudoalbus</i> ВКМ Ас-267	0,282	0,020	0,38
26	<i>Str. sp. (S. asterosporus)</i> ВКМ Ас-40	0,267	0,017	0,36
27	<i>Str. diastaticus</i> ВКМ Ас-723	0,080	0,016	0,30
28	<i>Str. diastatochromogenes</i> ЛИАИ 0172	0,078	0,013	0,27
29	<i>Str. griscofarillus</i> 187	0,250	0,009	0,35
30	<i>Str. coelicolor</i> ВНИИА 1173	0,070	0,008	0,20
31	<i>Str. cinereus</i> ВКМ Ас-84	1,451	0	0,55
32	<i>Str. chromofuscus</i> ВНИИА 1191	1,191	0	0,52
33	<i>Str. olivaceoscleroticus</i> ВНИИА 1445	1,173	0	0,51
34	<i>Str. canarius</i> 1392	0,764	0	0,42
35	<i>Str. griseus subsp. neomycini</i> 0047	0,670	0	0,40
36	<i>Str. argenteus</i> ВКМ Ас-39	0,628	0	0,40
37	<i>Str. aureus</i> 92	0,533	0	0,40
38	<i>Str. sp. (S. aculentosporus)</i> ВКМ Ас-1	0,392	0	0,38
39	<i>Str. olivaceus</i> ВКМ Ас-254	0,266	0	0,36
40	<i>Str. achromogenes</i> 1000	0,196	0	0,33
41	<i>Str. calvus</i> ВНИИА 1103	0,196	0	0,33
42	<i>Str. flavovirens</i> ВНИИА 421	0,178	0	0,33
43	<i>Str. albus</i> ВКМ Ас-35	0,109	0	0,25
44	<i>Str. albocanus</i> ВКМ Ас-7	0,080	0	0,22
45	<i>Str. olivaceus</i> ВНИИА 519	0,080	0	0,20
46	<i>Str. sp. (S. coeliatus)</i> ВКМ Ас-105	0,064	0	0,18
47	<i>Str. olivochromofuscus</i> ВНИИА-1259	0,062	0	0,18
48	<i>Str. fragilis</i> ВНИИА 1111	0,018	0	0,12
49	<i>Str. pseudogriseolus</i> ВНИИА 1106	0	0	0,10
50	<i>Str. sp. (S. sporocaneus)</i> ВКМ Ас-311	0	0	0,08

эффекта конкретно от ПА или КА. Он был выше у тех микроорганизмов, которые показали высокие значения ПА или КА. Так, наибольший флокулирующий эффект Д = 1,22 показал *Str. chromogenes subsp.graecus* 0832. При этом у него же были максимальные значения

ПА = 2,204 ед./см³ и КА = 3,00 ед./см³. На втором месте расположился *Str. californicus* 1015 с Д = 0,98, Но у него в отличие от *Str. chromogenes subsp.graecus* 0832 ПА была низкой – 0,133 ед./см³, а КА – высокой 2,6 ед./см³. Третье место занял *Str. firidochromogenes*

ВКМ Ас-629 с $D = 0,88$, который практически не показал КА (всего $0,040$ ед./см³), но обладающий высокой ПА = $2,5$ ед./см³.

Отсюда можно сделать вывод, что флокулирующий эффект не связан с проявлением специфичной активности ПА или КА, а наблюдается при наличии общей гидролитической (протеолитической) активности. Однако уровень флокулирующего эффекта зависит от уровня этой активности: чем она выше, тем выше эффект. Возможно, это связано с тем, что интенсивное высвобождение внеклеточных ферментов актиномицетов увеличивает количество растворимого белка в стоке, что активизирует ферментные системы и способствует более интенсивному гидролизу этих белков. В свою очередь гидролиз белков приводит к росту общего числа полярных групп, которые, ориентируясь в пространстве, образуют прочный адсорбционный слой. На него сорбируется следующий и т. д. В конечном итоге повышается общий эффект флокуляции.

На основании вышеизложенного материала, для дальнейших исследований нами был выбран актиномицет *Str. chromogenes subsp. graecus* 0832.

Рост и развитие микроорганизмов, биосинтез ими ферментов в значительной степени зависят от кислотности среды. Влияние величины pH на биосинтез ферментов *Str. chromogenes s.g. 0832* изучали в диапазоне pH от 5 до 12 (рис. 1).

На рис. 1 видно, что максимальные значения ПА и КА наблюдаются при доведении начальной величины pH до 11,0 (ПА = $3,778$ ед./см³; КА = $29,0$ ед./см³). Наибольшая растворимость кератина также достигается при этом значении pH и составляет 84 % (рис. 2).

Влияние возраста микроорганизма на синтез ферментов представлено на рис. 3. К 48 часам ее накапливается наибольшее количество. Максимальные значения ПА и КА наблюдаются к 48 часам культивирования: ПА = $6,044$ ед./см³, КА = $34,0$ ед./см³. Заметим, что ПА резко падает уже к 72 часам выращивания в отличие от КА, которая на протяжении 96 часов относительно стабильна (рис. 3).

Через 48 часов культивирования культуральную жидкость вносили в сток в соотношении 3:100 и через 10 мин. определяли показатели, характеризующие качество очистки сточной воды (табл. 2).

Результаты, представленные в табл. 2, показывают, что предлагаемый микроорганизм в качестве биофлуккуланта позволяет повысить эффективность очистки на 43 % по ХПК в сравнении с нормативными требованиями.

Проведенные исследования позволяют сделать следующий вывод: культура микроорганизма *Str. chromogenes s.g. 0832* может быть использована в очистке сточных вод, содержащих труднорастворимые белки.

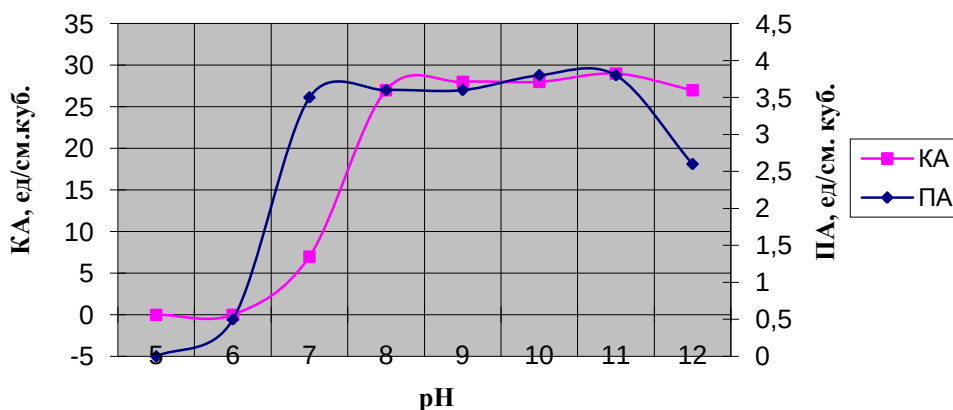


Рис. 1. Влияние величины pH на биосинтез протеиназ *Str. chromogenes s.g. 0832*

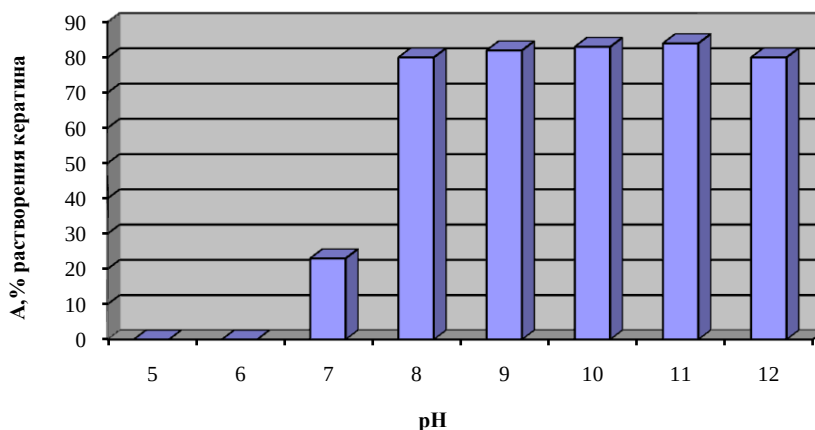


Рис. 2. Влияние величины pH на растворение кератина

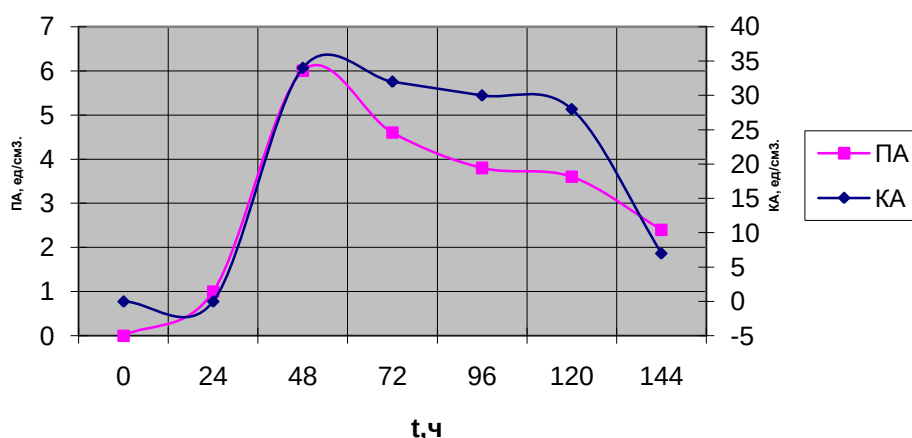


Рис. 3. Накопление протеолитической (ПА) и кератиназной (КА) активности у микроорганизма в зависимости от времени культивирования

Таблица 2

Физико-химические показатели сточной воды

Показатели	Исходный сток	КЖ + сток	Нормативные требования
ХПК, мг O_2 /дм ³	$1500 \pm 45,12$	$200 \pm 6,07$	$350 \pm 5,01$
Мутность, мг/дм ³	$4,2 \pm 0,11$	$1,3 \pm 0,01$	$2,5 \pm 0,21$
Общее железо, мг/дм ³	$1,15 \pm 0,01$	$0,27 \pm 0,01$	$1,33 \pm 0,01$
Общий азот, мг/дм ³	$160 \pm 2,03$	$52,3 \pm 1,01$	$120 \pm 17,4$

Установлена потенциальная возможность данного актиномицета к биосинтезу кератиназной протеиназы.

// Прикладная биохимия и микробиология. 1976. Т. 12. № 4. С. 563-571.

Поступила в редакцию 14 апреля 2015 г.

ЛИТЕРАТУРА

1. Брындина Л.В., Корнеева О.С., Перов С.Н. Очистка сточных вод мясокостных биосорбционным способом // Мясная индустрия. 2005. № 9. С. 36-38.
2. ГОСТ 20264.2-88. Методы определения протеолитической активности. Переизд. февр. 1985 с изм. Взамен ГОСТ 20264.1-74; введен с 01.07.88. М.: Изд-во стандартов, 1984. С. 1-11.
3. Кашкин А.П., Воеводин Ю.М., Гринберг Г.Е. Препараты протеолитических ферментов *Actinomyces fradiae* 0072 // Прикладная биохимия и микробиология. 1974. Т. 10. № 4. С. 515-520.
4. Кашкин А.П., Воеводин Ю.М., Маклова Т.Г. Характеристика внеклеточных протеолитических ферментов *Actinomyces fradiae* 0072

Bryndina L.V., Korneeva O.S., Polyanskiy K.K. STUDY OF ACTINOMYCETE ABILITY TO BIODEGRADATION OF HARD-DEGRADABLE PROTEINS IN SEWAGE OF MEAT-PACKING PLANTS

The ability of actinomycete to clean the sewage of meat-packing plants is studied. It was determined that the level of flocculation of the effect depends on proteolytic activity: the higher it is, the greater the effect is. The highest flocculation effect $D = 1.22$ showed *Str. chromogenes* subsp. *gracilis* 0832. Proposed as biflagellate microorganism exhibits a high specificity for the protein keratin.

Key words: bioflocculation; meat industry; sewage cleaning.

Брындина Лариса Васильевна, Воронежский государственный лесотехнический университет им. Г.Ф. Морозова, г. Воронеж, Российская Федерация, кандидат технических наук, доцент кафедры безопасности жизнедеятельности и правовых отношений, e-mail: lara.bryndina@yandex.ru

Bryndina Larisa Vasilyevna, Voronezh State Academy of Forestry Engineering, Voronezh, Russian Federation, Candidate of Technics, Associate Professor of Life Activities Safety and Legal Relations Department, e-mail: lara.bryndina@yandex.ru

Корнеева Ольга Сергеевна, Воронежский государственный университет инженерных технологий, г. Воронеж, Российская Федерация, доктор биологических наук, профессор кафедры микробиологии и биохимии, e-mail: lara.bryndina@yandex.ru

Korneeva Olga Sergeevna, Voronezh State University of Engineering Technologies, Voronezh, Russian Federation, Doctor of Biology, Professor of Microbiology and Biochemistry Department, e-mail: lara.bryndina@yandex.ru

Полянский Константин Константинович, Воронежский филиал Российского экономического университета им. Г.В. Плеханова, г. Воронеж, Российская Федерация, доктор технических наук, профессор кафедры коммерции и товароведения, e-mail: lara.bryndina@yandex.ru

Polyanskiy Konstantin Konstantinovich, Plekhanov Russian University of Economics, Voronezh Branch, Voronezh, Russian Federation, Doctor of Technics, Professor of Commerce and Studies of Goods Department, e-mail: lara.bryndina@yandex.ru