



ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ БИОМАССЫ *HYPOMYCES ROSELLUS* — ОТХОДА ПОЛУЧЕНИЯ КРАСИТЕЛЯ — В ОЧИСТКЕ ВОДЫ ОТ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

А.Д. Буракаева, Е.В. Левин, Р.Ф. Сагитов, Т.С. Ковтунова

**ОАО "Научно-исследовательский и проектный институт экологических проблем",
г. Оренбург**

В последние годы предпринимаются попытки утилизировать ценные компоненты биомассы микроскопических грибов — отходов микробиологических производств. Полисахариды клеточной стенки грибов широко используются для получения различных биосорбентов, причем главным образом высокомолекулярные — хитин или хитин-глюкановый комплекс. Нами разработан метод получения полисахаридного комплекса из биомассы микроскопического гриба *Hypomyces rosellus* ВКП F-242 — отхода получения красителя, изучены его некоторые физико-химические и сорбционные свойства. Согласно данным ИК-спектра и элементному анализу выделенный из мицелия полисахаридный комплекс близок к хитину ракообразных и других мицелиальных грибов. Полисахаридный комплекс обладает более высокой сорбционной способностью, чем отработанная биомасса гриба. Степень извлечения ионов металлов составляет для ионов Al^{3+} — 89 и 77 %, Cu^{2+} — 96 и 55 % и Co^{2+} — 80 и 70% соответственно.

Ключевые слова: микроскопический гриб *Hypomyces rosellus*, полисахаридный комплекс, хитин, очистка сточных вод, ионы металлов.

The Efficiency of Using Biomass *Hypomyces Rosellus* — Waste Reception Dye — in Water Purification from Heavy Metals

A.D. Burakaeva, E.V. Levin, R.F. Sagitov, T.S. Kovtunova

Open Joint Stock Company "Scientific Research and Design Institute of Ecological Problems", Orenburg city

In recent years, attempts are made to utilize valuable components of the biomass of microscopic fungi-waste of microbiologic productions. Polysaccharides of a cellular wall of fungi are widely used to obtain various biosorbents, mainly high-molecular ones-chitin or chitin-glucan complex. We developed the method of fabrication of polysaccharide complex from the biomass of the *Hypomyces rosellus* VKP F-242 microscopic fungus-the manufacturing waste of the dye, and investigated its certain physicochemical and sorption properties. According to the data of the IR spectrum and elemental analysis, a polysaccharide complex isolated from mycelium is close to chitin of crustaceans and other filamentous fungi. A polysaccharide complex possesses the higher sorption ability than the worked-out fungus biomass. The degree of recovery of metal ions is 89% and 77% for Al^{3+} , 96% and 55% for Cu^{2+} , and 80% and 70% for Co^{2+} , respectively.

Keywords: *Hypomyces rosellus* microscopic fungus, polysaccharide complex, chitin, sewage treatment, metal ions

В общем объеме продукции физиологически активных соединений, получаемых путем микробиологического синтеза, большая часть приходится на микроскопические грибы. Вопросы утилизации отходов крупнотоннажных микробиологических и пищевых производств остаются по настоящее время практически нерешенными, основная часть влажной биомассы не утилизируется и попадает на очистные сооружения. Из литературных данных известно, что основным компонентом клеточных стенок микроскопических грибов являются полиаминосахариды (хитин) и глюканы. В последние годы эта группа полисахаридов вызывает большой интерес, что обусловлено их высокой способностью к комплексообразова-

нию и в связи с этим возможностью использования в качестве сорбентов [1 — 3].

Микроскопический гриб *Hypomyces rosellus* ВКПМ F-242 описан в литературе как продуцент красителя, протеолитических ферментов, углеводов, практически ценных жирных кислот (Пат. 2016026 РФ) [4].

Цель данной работы — изучение сорбционных свойств отработанной биомассы *Hypomyces rosellus* в отношении некоторых металлов, выделение и изучение физико-химических свойств полисахаридного комплекса (ПСК).

Объект и методы исследований

В работе использовалась биомасса микроскопического гриба *Hypomyces rosellus*

ВКПМ F-242 — отход получения красителя (Пат. 2016026 РФ). Биомассу определяли весовым методом, белок в мицелии — методом Лоури согласно [5]. Сорбционные свойства биомассы и ПСК изучали на примере очистки индивидуальных растворов катионов Co^{2+} и Cu^{2+} при соотношении модельного раствора к биомассе 100:1 согласно методу [6]. Содержание Al^{3+} определяли согласно ГОСТ 18165-89. Предел обнаружения алюминия с доверительной вероятностью $P=0,95$ составляет $0,02 \text{ мг/дм}^3$ при объеме пробы 25 см^3 . ПСК выделяли по модифицированному методу В.М. Терешинной и др. [7]. Определение физико-химических характеристик ПСК проводили с использованием спектральных методов анализа. ИК-спектр снимали на спектрофотометре

"Specord" M-80 (внутренний стандарт тетраметилсилан). Элементный анализ ПСК проводили на анализаторе "Karlo Erda" модели 1106.

Результаты и их обсуждение

Отход получения красителя и других продуктов метаболизма микроскопического гриба *Nurotomyces gosellus* представляет собой разрушенные и частично обезжиренные клетки мицелия. Тяжелые металлы по степени опасности занимают второе место после пестицидов [8]. Для удаления тяжелых металлов из сточных вод промышленных предприятий предложен целый ряд физико-химических методов: гравитационное осаждение, флотация, адсорбция, фильтрация, обратный осмос, электродиализ, дистилляция и химическое осаждение. По мнению многих исследователей, химические методы не годятся для очистки вод с низкими концентрациями ионов металлов. Сорбция ионов металлов микробной биомассой является одним из возможных методов детоксикации сточных вод и обусловлена их взаимодействием с клеточной стенкой. Адсорбция металлов на поверхности клеток мицелиальных грибов, как полагают, связана с присутствием отрицательно заряженных групп анионов: PO_4^{3-} , COO^- , HS^- , OH^- . Адсорбция происходит быстро, обратимо, не зависит от температуры и энергетического метаболизма [9].

Широкий спектр сорбционных свойств и низкая себестоимость биомассы микроскопических грибов — отходов крупнотоннажных микробиологических и пищевых производств — позволяет использовать их для предварительной обработки сточных вод биологических очистных сооружений с целью исключения гибели активного ила. Как правило, микроорганизмы активного ила весьма чувствительны к тяжелым металлам. Согласно действующим в нашей стране нормати-

вам, максимальная концентрация $Al(III)$, $Co(II)$ и $Cu(II)$ в стоках, поступающих на биологическую очистку, не должна превышать 5,0; 1,0 и 0,5 мг/л соответственно [10].

Для анализа биосорбирующей способности биомассы гриба относительно ионов Co^{2+} готовили стандартные образцы растворов $Na_3[Co(NO_2)_6]$, измеряли их оптические плотности (D) на фотоэлектроколориметре КФК-2 при длине волны $\lambda = 400$ нм. По полученным результатам строили градуировочный график (рис. 1).

Для анализа биосорбирующей способности биомассы гриба относительно ионов Cu^{2+} готовили стандартные образцы растворов $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, измеряли их оптические плотности на фотоэлектроколориметре КФК-2 в области максимума поглощения ионов Cu^{2+} , т.е. при длине волны 750 нм. По полученным результатам строили градуировочный график (рис. 2).

Степень адсорбции (Q) биомассой гриба ионов Al^{3+} определяли по методу, в основе которого лежит способность иона Al^{3+} образовывать с алюминиевым лак оранжево-красного цвета, представляющий собой комплексное соединение. В качестве стандартной нулевой пробы брали дистиллированную воду и рабочий раствор алюминия.

Мицелий гриба, предварительно выращенный в глубинных условиях на питательной среде в течение 4-х суток, подвергали дезинтеграции, обрабатывали смесью хлороформ-изопропанол (2:1) с целью извлечения пигмента (Пат. 2016026 РФ). После этого мицелий отделяли, вносили в колбы с модельными растворами с исходным содержанием металлов 0,2 мг/л в соотношении 1:100 и выдерживали в течение 24 ч.

По градуировочным графикам, определив остаточные ионы металлов в растворах после адсорбции, рассчитали степень адсорбции мицелия, которая

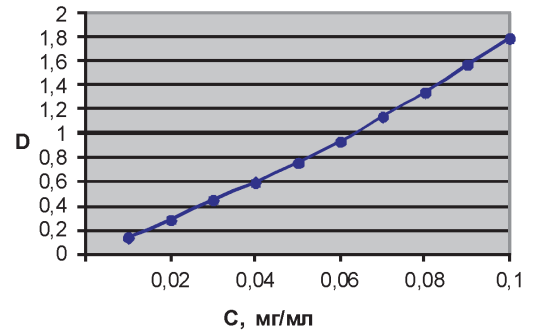


Рис. 1. Зависимость оптической плотности от концентрации ионов Co^{2+} в модельном растворе

составила для ионов Co^{2+} — 70 %, Cu^{2+} — 55 % и Al^{3+} — 77 %. Мицелий с иммобилизованным на нем металлом отделяли от раствора фильтрованием и высушивали при 120 °С.

Следующим этапом работы была разработка метода получения ПСК (рис. 3). Дезинтегрированная биомасса мицелия подвергалась обработке горячей водой с добавлением 0,02 — 0,05 % детергента (стиральный порошок "Зифа") и 1 % спирта этилового в соотношении 1:5. Эта операция, по мнению исследователей, способствует нарушению проницаемости клеточных стенок, что значительно сокращает общепринятые по очистке хитина процедуры щелочных и кислотных обработок [11]. Для удаления остатков свободных и связанных с клеточной стенкой липидов, а также остаточного количества пигмента биомассу мицелия последовательно обрабатывали органическими растворителями: гексаном, смесью хлороформ-изопропанол (2:1), смесью этанол-серный эфир (2:1). После отделения от реакционной смеси

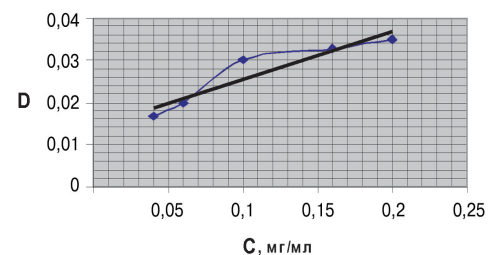


Рис. 2. Зависимость оптической плотности от концентрации ионов Cu^{2+} в модельном растворе

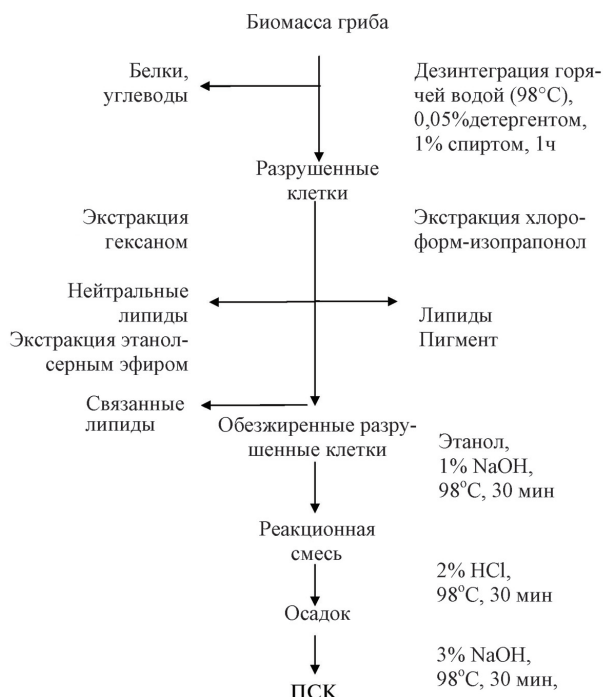


Рис. 3. Схема выделения ПСК

очистку полисахаридного осадка проводили при добавлении к нему абсолютного этанола с 1 %-ной щёлочью (10:1) при комнатной температуре в течение 30 мин при постоянном перемешивании. Далее осадок отделяли от реакционной смеси, затем подвергали повторному нагреву в течение 30 мин при $t = 90 \div 98^\circ\text{C}$ в присутствии 2 %-ного раствора HCl в соотношении (1:10) и отделяли. На последнем этапе промытый водой ПСК повторно нагревали при температуре $95 - 98^\circ\text{C}$ в течение 30 мин в присутствии 3 %-ного раствора NaOH в соотношении 1:10, продукт еще раз обрабатывали 80 %-ным спиртом и высушивали. Выход ПСК на 4-е сутки роста составлял 32 % и на 6-е сутки роста — 44 % от абсолютно сухой массы мицелия.

ПСК представлял собой мелкие нити от белого до светло-кремового цвета, нерастворимые в воде, органических растворителях, слабых кислотах и щелочах, но частично растворимые в концентрированной соляной кислоте. Результаты элементного анализа дают основание считать, что ПСК содержит, %: 43,77 C;

6,44 H; 5,88 N, 42,9 O.

В ИК-спектре ПСК проявляются интенсивные полосы с максимумами 1560 и 3300 cm^{-1} , относящиеся к амидной группе, и 1655 cm^{-1} , характеризующие поглощение $\text{C}=\text{O}$ группировки ацетамидной группы, а также проявляются полосы поглощения средней интенсивности при 1380 cm^{-1} , соответствующие колебаниям C-N групп. Наблюдается широкая интенсивная полоса с максимумами 1150 cm^{-1} , относящаяся к валентным ко-

лебаниям C-O групп вторичных спиртов.

ПСК показал более высокую по сравнению с биомассой сорбирующую способность: для ионов Co^{2+} — 80 %, Cu^{2+} — 96 %, Al^{3+} — 89 %, однако его получение требует гораздо более высоких экономических затрат.

Результаты наших исследований показали, что биомасса микроскопического гриба — отход получения красителя — обладает способностью адсорбировать ионы металлов. Выделенный ПСК по физико-химическим характеристикам оказался близок к хитину ракообразных.

Удаление ионов металлов из промышленных стоков с помощью отходов микробиологических производств позволит обеспечить оптимальную работу биологических очистных сооружений, в частности активного ила.

Литература

1. Жилин О.В. Биосорбция и трансформация золота и сопутствующих тяжелых металлов микромицетами : дис. ... канд. биол. наук : 03.00.07 : Благовещенск. 2003. 124 с.
2. Гальбрайт Л.С. Хитин и хитозан: строение, свойства, применение // Соросовский образовательный журнал. 2001. Т. 7. №1. С 51-61.
3. Скрябин К.Г., Вихорева А.Г., Варламова В.П. Хитин и хитозан: Получение, свойства и применение. М.: Наука, 2002. 368 с.
4. Буракаева А.Д. Микрофильные грибы — продуценты практически важных продуктов: монография. Оренбург: НОУ ВПО МТИ "ВТУ". 2013. 160 с.
5. Филиппович Ю.Б., Егорова Т.А., Севастьянова Г.А. Практикум по общей биохимии. М., 1982. С.192-216, 277-278.
6. Лурье Ю.Ю., Рыбникова А.И. Химический анализ производственных сточных вод. М.: Химия, 1974. 464 с.
7. Терешина В.М., Меморская А.С., Феофилова Е.П. и др. Получение из мицелиальных грибов полисахаридных комплексов и определение степени их деацетилирования // Микробиология. 1997. Т.66. № 1. С. 84-89.
8. Monachese Marc, Burton Jeremy P., Reid Gregor. Bioremediation and tolerance of humans to heavy metals through microbial processes: A potential role for probiotics? // Appl. and Environ. Microbiol. 2012. V. 78. № 18. P. 6397-6404.
9. Илялетдинов А.Н. Микробиологическая очистка воды от тяжелых металлов // Водные ресурсы. 1980. № 2. С.158-169.
10. Методические рекомендации по расчету количества и качества принимаемых сточных вод и загрязняющих веществ в системы канализации населенных пунктов (МДК 3-01.2001).
11. Феофилова Е.П. Клеточная стенка грибов. М.: Наука, 1983. 246 с. ■

Авторы: Буракаева А.Д. — канд. биол. наук, доцент, ст. науч. сотрудник ОАО "Научно-исследовательский и проектный институт экологических проблем", e-mail: aigulburakaeva@mail.ru • Левин Е.В. — канд. физ.-мат. наук, ген. директор, e-mail: elevelin62@gmail.com • Сагитов Р.Ф. — нач. отдела инноваций и инвестиций, e-mail: rsagitov@mail.ru • Ковтунова Т.С. — соискатель, e-mail: aigulburakaeva@mail.ru