

Биодеградация на фенол с имобилизирани клетки на *Aspergillus awamori* и *Trichosporon cutaneum* върху полиамидни гранули

Галина Йорданова, Цонка Годжевъргова, Данка Иванова

Abstract: The immobilized system of *Aspergillus awamori* NRRL 3112 and *Trichosporon cutaneum* R57 / modified polymer beads (PA) was created and its phenol biodegradation was studied. Experiment for biodegradation of phenol with concentration in the range of 0,5 - 1,4 g l⁻¹ were conducted. The advantages of the combined immobilized system for biodegradation of phenol with high concentrations than the separate immobilized systems of the two stains were proved.

Key words: *Aspergillus awamori*, *Trichosporon cutaneum*, phenol, biodegradation

ВЪВЕДЕНИЕ

Фенолът и неговите производни са един от основните замърсители на околната среда. Те присъстват в отпадните води на много производства. Проведени са многобройни изследвания, разкриващи потенциалните възможности на микроорганизмите за биодеградация на фенол. Основна част от изследванията за фенолно разграждане са извършени с бактериални щамове на *Alcaligenes eutrophus*, *Pseudomonas* sp., и *Phanerochaete chrysosporium* [1, 3, 6]. Други публикации описват усвояването на фенол от щамове на дрождите *Candida* и *Trichosporon* [2, 7]. Използването на гъби има редица предимства, тъй като гъбите оцеляват в присъствие на голям брой ксенобиотици, токсични за други микроорганизми [4, 10]. Интересът към дефинираните смесени култури непрекъснато нараства поради значимите ефекти, които се получават в резултат на съвместната метаболитна активност на културите [11].

В последните години нараства интересът към имобилизираните клетки и тяхното приложение за биодеградация на фенол [5, 8]. Krastanov and Sundar изследват биодеградацията на фенол от свободни и имобилизирани клетки на щам *Aspergillus awamori* NRRL 3112 в алгинатни гранули [9]. Yordanova et.al. имобилизират клетки на щам *Aspergillus awamori* NRRL 3112 върху модифициран и чист силикагел и изучават техните потенциални възможности за разграждане на фенол [12].

В тази връзка е създадена ефективна комбинирана биодеградационна система от имобилизирани клетки на щамовете *Aspergillus awamori* NRRL3112 и *Trichosporon cutaneum* R57 върху полиамидни гранули и са изследвани нейните потенциални възможности за биодеградация на фенол.

Материали и методи

1. Микробни щамове

В процеса на изследванията са използвани щам *Aspergillus awamori* NRRL 3112 изолиран от катедрата по Агрокултури, щата Илинойс, Америка и щам *Trichosporon cutaneum* R57, регистриран в националната банка по промишлени микроорганизми и клетъчни култури под № 2414/1994 г. Съхраняват се върху агаризирана пивна мъст при 4°C.

2. Хранителна среда

- Среда на Чапек: 0,3 g малтоза; 0,2 g NaNO₃; 0,1 g KH₂PO₄; 0,05 g KCl; 0,05 g MgSO₄; 0,001 g FeSO₄.7H₂O при pH 5,5.

3. Условия за култивиране

При периодично култивиране на щамовете е използвана среда на Чапек. За посев в течната среда се използва 24 часова култура на *Trichosporon cutaneum* и 48 часова култура на *Aspergillus awamori* върху агаризирана пивна мъст (бирен агар). Като въглероден източник се използва фенол с постепенно нарастваща концентрация (0.5 – 2.0 g l⁻¹). Основните параметри на култивиране са: T=30°C и

аериране на клатачен апарат при 180 – 200 об/мин. Продължителността на култивиране е различна, съобразно концентрацията на фенол и скоростта на деградация. Следи се растежа на културите и усвояването на въглеродния източник на определено време.

4. Определяне растежа на клетките

Растежът на клетките се определя чрез измерване на суха биомаса. За целта се взема проба, която се центрофугира при 5000 об/мин, суши се до 105°C и се претегля.

5. Получаване на модифициран полимерен носител [13].

6. Имобилизация на *Aspergillus awamori* NRRL 3112 и *Trichosporon cutaneum* R57

Спорите на *Aspergillus awamori* NRRL 3112 се внасят чрез смив (5 cm³ пивна мъст) в стерилна колба от 500 cm³ съдържаща 45 cm³ пивна мъст и стерилен модифициран ПА носител (0,5 g). Колбата се поставя на клатачен апарат за 48 часа при температура 30°C. След това се отдекантира течната среда и имобилизираният носител се промива с определено количество стерилна вода за отстраняване на свободните клетки. Имобилюзираният щам се адаптира с 0,3 g l⁻¹ фенол за 48 часа. Отделно се имобилизират клетки на *Trichosporon cutaneum* R57, чрез внасяне на 18 часов инокулум (10 ml) в колба от 500 cm³ съдържаща 40 cm³ пивна мъст и стерилен модифициран ПА носител (0,5 g). Имобилюзацията продължава 24 часа и след това по същият начин се промиват имобилизираните клетки. Двата вида имобилизирани микроорганизми се събират в обща колба и към тях се добавят 50 cm³ течна среда на Чапек и фенол като единствен въглероден източник с определена концентрация.

7. Метод за определяне концентрацията на фенол

Концентрацията на фенол се определя спектрофотометрично с р-нитроанилин [14].

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Изследвана е комбинираната биодеградационната способност на два вида имобилизирани клетки - *Aspergillus awamori* и *Trichosporon cutaneum* спрямо фенол. Направено е сравнение на времето за пълното разграждане на фенол чрез комбинираното действие на двата щама и самостоятелното им действие. Експериментите са проведени с еднакво количество имобилизирани клетки. Отношение между количеството имобилизирани клетки на двата щама в комбинираната система е 1:1. Получените резултати са представени в табл. 1.

Табл.1. Сравнение на времето (h) за пълно разграждане на фенол чрез комбинирано и самостоятелно действие на имобилизирани клетки на *Tr.cutaneum* и *Asp.awamori* без предварително адаптиране

Концентрация на фенол, g l ⁻¹	0,5	1,0	1,2
имобилизирани клетки			
<i>Tr.cutaneum</i>	24	48	-
<i>Asp.awamori</i>	48	-	-
<i>Tr.cutaneum</i> + <i>Asp.awamori</i>	27	48	65

От таблицата се вижда, че времето на биодеградация на фенол с концентрация 0,5 g l⁻¹ е най-малко при имобилизираните клетки на *Tr.cutaneum*, а най-голямо при имобилизираните клетки на *Asp.awamori*. Наблюдава се увеличаване на времето за пълно разграждане на фенол с нарастване на концентрацията му. При концентрация

на фенол $1,0 \text{ g l}^{-1}$ времето на системата от двата щама за пълно разграждане на фенол е идентично с това на имобилизираните клетки на *Tr.cutaneum*, независимо че количеството на клетките на *Tr.cutaneum* в комбинираната система е два пъти по-малко, от това на самостоятелно имобилизираните клетки на *Tr.cutaneum*. Иmobилизираните клетки на *Asp.awamori* не могат да се развият при тази концентрация. При концентрация на фенол $1,2 \text{ g l}^{-1}$ единствено комбинираната имобилизирана система напълно разгражда въглеродния източник за 65 часа. Получените резултати убедително показват по добрия потенциал на комбинацията от имобилизирани клетки от двата щама за биодеградацията на фенола.

Проучена е възможността дали чистия носител може в хода на биодеградационния цикъл да адсорбира фенол. За целта в две стерилни колби с $0,5\text{g}$ и $1,0 \text{ g}$ РА гранули (стерилни), се добавя хранителна среда и фенол с концентрация $0,5 \text{ g l}^{-1}$ и се разбърква на клатачен апарат за едно денонощие. Анализите показват, че концентрацията на фенола не се променя значително.

Направено е сравнение на времето за пълната биодеградация на фенол с неадаптирани и предварително адаптирани имобилизирани клетки при ниска концентрация на фенол – $0,3 \text{ g l}^{-1}$, приложени самостоятелно и комбинирано, табл.2. Установено е, че биодеградацията на фенол е по-ефективна с предварително адаптирани имобилизирани клетки и това е много по-изявено при използването на по-високи концентрации фенол.

Табл.2. Сравнение на времето (h) за пълно разграждане на фенол чрез адаптирани и неадаптирани имобилизирани клетки на *Tr.cutaneum* и *Asp.awamori*

Фенол, g.l^{-1}	Без адаптация			С адаптация		
	<i>Tr. cutaneum</i>	<i>Asp. awamori</i>	<i>Tr.cutaneum</i> + <i>Asp.awamori</i>	<i>Tr. cutaneum</i>	<i>Asp. awamori</i>	<i>Tr.cutaneum</i> + <i>Asp.awamori</i>
0,5	24	48	27	24	48	24
1,0	48	-	48	36	-	39
1,2	-	-	65	48	-	56
1,3	-	-	-	-	-	63
1,4	-	-	-	-	-	80

Получените биодеградационни времена на двата вида микроорганизми действащи самостоятелно и комбинирано са сравнени с тези на съответните свободни клетки, табл.3. Очевидно е предимството на имобилизираните клетки пред свободните за разграждане на по-високи концентрации от фенол, поради тяхната по-голяма стабилност.

Табл.3 Сравнение на времето (h) за пълно разграждане на фенол чрез свободни и имобилизирани адаптирани клетки на *Tr.cutaneum* и *Asp.awamori*

Фенол, g l^{-1}	Иmobилизирани клетки			Свободни клетки		
	<i>Tr. cutaneum</i>	<i>Asp. awamori</i>	<i>Tr.cutaneum</i> + <i>Asp.awamori</i>	<i>Tr. cutaneum</i>	<i>Asp. awamori</i>	<i>Tr.cutaneum</i> + <i>Asp.awamori</i>
0,5	24	48	24	24	48	24
1,0	36	-	39	24	-	72
1,2	48	-	56	-	-	-
1,3	-	-	63	-	-	-
1,4	-	-	80	-	-	-

От табл.3 се вижда, че комбинацията от двата имобилизирани щама разгражда високи концентрации на фенол ($1,3$ и $1,4 \text{ g l}^{-1}$), докато самостоятелно имобилизираните клетки нямат тези възможности. Получените резултати убедително показват големите потенциални възможности на комбинираната имобилизационна система за непрекъснато разграждане на високи концентрации на фенол.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

- 1.Получен е модифициран полиамиден носител.
- 2.Проведена е съвместна и самостоятелна ковалентна имобилизация на клетките на *Tr.cutaneum* и *Asp.awamori* върху модифицираните гранули.
- 3.Изследвани са деградационните способности на самостоятелните и комбинирани имобилизационни системи спрямо фенол и е доказано, че комбинираната система има най-голяма ефективност.

ЛИТЕРАТУРА

- 1.Allsop P.J., Chisti Y., Moi-Youngand M., and Sullivan G.R. Dynamics of phenol degradation by *Pseudomonas putida*. Biotech. Bioeng. 1993; 41:572-9.
- 2.Chtourou M., Ammar E., Nasri M., Medhioub K. Isolation of a yeast, *Trichosporon cutaneum*, able to use low molecular weight phenolic compounds: application to olive mill waste water treatment.J.Chem.Tech.Biotech. 2004; 79:869-78.
- 3.Garcia IG, Pena PRJ, Venceslada JLB, Martin AM, Santos MAM, Gomez ER. Removal of phenol compounds from olive mill waste water using *P. chrysosporium*, *A. niger*, *A. terreus* and *G. candidum*. Process Biochem 2000; 35:751-8.
- 4.Grit Kabiersch a,↑, Johanna Rajasärkkä a, René Ullrich b, Marja Tuomela a, Martin Hofrichter b, Marko Virta a, Annele Hatakka a, Kari Steffen Fate of bisphenol A during treatment with the litter-decomposing fungi *Stropharia rugosoannulata* and *Stropharia coronilla* Chemosphere 83 (2011) 226–232.
- 5.Godjevargova T., Ivanova D., Aleksieva Z., Burdelova G. Biodegradation of phenol by immobilized *Trichosporon cutaneum* R57 on modified polymer membranes. Process Biochem.2006; 41, 2342-2346.
- 6.Hudges E.J.L., Bayly R.C., Skurray R.A. Evidence for isofunctional enzymes in the degradation of phenol, *m*- and *p*-toluate, and *p*-cresol at catechol meta-cleavage pathways in *Alcaligenes eutrophus*. Bacteriol 1984; 158:79-83.
- 7.MacGillivray A, Shiaris A. Biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons by yeasts isolated from coastal sediments. Appl Environ Microbiol 1993; 59:1613-8.
- 8.Pazarlioglu N., Telefoncu A. Biodegradation of phenol by *Pseudomonas putida* immobilized on activated pumice particles. Process Biochem 2005; 40:1807-14.
- 9.Sundar P, Daniel D, Krastanov A, Biodegradation of phenol by immobilized *Aspergillus awamori* cells, *Bulg. J. Agric. Sc.*,2005,11: 61-71.
- 10.Toure O, Chahal PS, Ishaque M and Chahal DS. Biodegradation of phenol with two basidiomycetous white-rot fungi *Studies in Environmental Science* 1997; 66: 649-664.
- 11.Szambelan K.,Nowak J.,Czarnecki Z. Biotechnol. Letters 2004; 26:845-848
- 12.Yordanova G, Ivanova D,Godjevargova Tz, Krastanov A. Biodegradation of phenol by immobilized *Aspergillus awamori* NRRL3112 cells. Scientific works. ,2006, 1:260-65.
- 13.Yordanova G, Ivanova D,Godjevargova Tz, Krastanov A. Biodegradation of phenol by immobilized *Aspergillus awamori* NRRL3112 on modified polyacrylonitrile membrane. *Biodegradation*, 2009, 20:717-726.
- 14.Лурие Ж, Унифициране методи анализ вод, Гимия, Москва, 1973.

За контакти:

Ас. Галина Йорданова – Университет “Проф. д-р Асен Златаров”, катедра Биотехнология, тел. 056/858335, e-mail: burdelova@abv.bg
Проф. д-р Цонка Годжевъргова –, Университет “Проф. д-р Асен Златаров”, катедра Биотехнология, тел. 056/858353, e-mail: godjevargova@yahoo.com

Докладът е рецензиран