Diversity and activity of cultivated lipophilic bacteria from fat-containing industrial wastesGerasimchuk A.L.^{1,2}, Bukhtiyarova P.A.¹, Antsiferov D.V.¹, Ivashenko D.A.^{1,2}¹TomBioTech LLC, Tomsk, Russia; ²Tomsk State University, Tomsk, Russia

E-mail: gerasimchuk_ann@mail.ru

Key message. Pure cultures of lipophilic microorganisms of different phylogenetic groups were isolated from fat-containing industrial wastewaters. The strains of the genera *Pseudomonas* and *Bacillus* were the most active lipolytic microorganisms.

Keywords: lipophilic microorganisms, lipolytic enzymes, wastewater of food industry, fats utilization

Fat-containing wastes are accumulated in large quantities in sewage treatment plants as a result industrial food production and represent a serious environmental problem. Microorganisms that decompose various types of fats may be potential candidates for development of biological products for destruction of this type of wastes.

The aim of the study was to obtain pure cultures of lipophilic bacteria from fat-containing wastes, to study their diversity and activity for the development of a novel biological product.

Pure cultures were isolated using a mineral nutrient medium with either vegetable oil or pork fat as a carbon source. The lipolytic properties of the strains were evaluated by the growth results in the Stern glycerol-fuchsin broth. Phylogenetic analysis was performed by PCR amplification followed by sequencing of 16S rRNA gene fragments with oligonucleotide primers 27F and 1492R. Lipolytic activity was determined by the Ota-Yamada method. The quantitative composition of fatty acids was determined by gas chromatography with flame ionization detection.

Pure bacterial cultures (31 strains) with proposed lipolytic properties were isolated from wastewater samples derived from the milk factory storage pond and the grease trap of the meat processing plant. Phylogenetic analysis allowed to identify and exclude potentially pathogenic strains. Non-pathogenic isolates belonged to *Gammaproteobacteria* (representatives of *Pseudomonas nitroreducens*, *P. synxantha*, *P. extremaustralis* and *P. citronellolis*), *Betaproteobacteria* (*Microvirgula curvata*) and *Firmicutes* (*Bacillus subtilis* and *Brevibacillus brevis*).

The analysis of lipolytic activity showed that all strains were able to utilize vegetable and milk fats as carbon and electron sources. The maximum lipolytic activity of $40 \mu\text{mol} \times \text{h}^{-1} \times \text{ml}^{-1}$ was observed for the strain *Bacillus subtilis* B34. Analysis of the quantitative composition of fatty acids in the culture fluid of the most active strains of *Pseudomonas* A13, B11 and *B. subtilis* B34 was performed. The results of this analysis demonstrated the fact of fats hydrolysis with the formation of free fatty acids. Based on the results obtained in the study, isolated strains are promising for the development of commercial biological product for destruction of fat-containing wastes.

This work was supported by The Foundation for Assistance to Small Innovative Enterprises in Science and Technology, contract No. 2575GS1 / 41327.

Разнообразие и активность культивируемых липофильных бактерий из жиросодержащих отходов промышленных предприятийГерасимчук А.Л.^{1,2}, Бухтиярова П.А.¹, Анциферов Д.В.¹, Ивашенко Д.А.^{1,2}¹ООО «ТомБиоТех», Томск, Россия; ²Томский государственный университет, Томск, Россия

Аннотация. Из жиросодержащих промышленных сточных вод выделены чистые культуры липофильных микроорганизмов разных филогенетических групп. Наиболее активными липолитиками оказались штаммы родов *Pseudomonas* и *Bacillus*.

Ключевые слова: липофильные микроорганизмы, липолитические ферменты, сточные воды пищевых предприятий, утилизация жиров

Образующиеся в результате промышленного производства пищевой продукции жиросодержащие отходы в больших количествах накапливаются в стоках и очистных сооружениях и представляют серьезную экологическую проблему. Микроорганизмы, разлагающие различные типы жиров, могут быть потенциальными кандидатами для создания биопрепаратов-деструкторов.

Цель исследования – получить чистые культуры липофильных бактерий из жиросодержащих отходов, изучить их разнообразие и активность для разработки биопрепарата.

Чистые культуры получали с использованием минеральной питательной среды с растительным маслом или свиным жиром в качестве источника углерода. Липолитические свойства культур оценивали по результатам роста в глицерино-фуксиновом бульоне Штерна. Филогенетический анализ проводили методом ПЦР-амплификации и секвенирования фрагментов генов 16S рНК с праймерами 27F и 1492R. Липолитическую активность определяли по методу Ота-Ямада. Количественный состав жирных кислот определяли методом газовой хроматографии с пламенно-ионизационным детектированием.

Из проб сточных вод пруда-накопителя молочного комбината и жиросодержащих очистных сооружений мясоперерабатывающего комбината выделены чистые культуры бактерий (31 штамм) с липолитическими свойствами. Филогенетический анализ помог выявить и исключить из исследования патогенные штаммы. Остальные культуры относились к классам *Gammaproteobacteria* (представители *Pseudomonas nitroreducens*, *P. synxantha*, *P. extremaustralis* и *P. citronellolis*), *Betaproteobacteria* (*Microvirgula curvata*) и отделу *Firmicutes* (*Bacillus subtilis* и *Brevibacillus brevis*).

Анализ липолитической активности показал, что все штаммы способны утилизировать растительный и молочный жир. Максимальная измеренная липолитическая активность в $40 \mu\text{моль} \times \text{ч}^{-1} \times \text{мл}^{-1}$ отмечена для штамма *Bacillus subtilis* B34.

Анализ количественного состава жирных кислот в культуральной жидкости наиболее активных штаммов *Pseudomonas* A13, B11 и *B. subtilis* B34 продемонстрировал процессы гидролиза жиров с образованием свободных жирных кислот. Исходя из полученных результатов, выделенные штаммы перспективны для разработки биопрепарата-деструктора жиросодержащих отходов.

Работа выполнена при поддержке Фонда содействия инновациям, договор № 2575ГС1/41327.