

Latvijas mālu pielietošana biotehnoloģijā: rezultāti un perspektīvas

Olga Muter¹, Vizma Nikolajeva^{2, 1,2} *Latvijas Universitāte*

Kopsavilkums. Mūsu pētījumi ir saistīti ar Latvijas māliem un no tiem iegūtām šūnainās keramikas granulām. Pētījumi par keramikas nesējmateriālu izveidi sastāv no trim apakšvirzieniem: 1) izejmateriāla testēšana un keramikas nesējmateriālu izgatavošanas tehnoloģijas izstrāde; 2) bioplēves veidošanās uz keramikas granulām: dinamika un noturība; 3) vides attīrīšanas modeļu eksperimenti. Šajā rakstā ir apkopoti galvenie rezultāti par laika periodu no 2010. līdz 2013. gadam, kā arī ieskicēti perspektīvi virzieni turpmākai pētīšanai.

Atslēgas vārdi: māls, keramika, biotehnoloģija, mikroorganismi, adhēzija, bioplēve.

I. IEVADS

Šūnu imobilizācija palielina daudzu bioloģisko un biotehnoloģisko procesu efektivitāti. Imobilizētām šūnām salīdzinājumā ar suspendētām ir tādas priekšrocības kā stabilitāte, biomasas uzkrāšanās caurteces reaktoros un pastiprināta bioķīmiskā aktivitāte tilpuma vienībā.

Mikrobioloģiskā adhēzija ir sākotnējais solis kolonizācijai un bioplēves veidošanai. Bioplēve sastāv no mikroorganismiem un ārpusšūnu materiāliem. Daudzreiz mikrobioloģiskā adhēzija var būt izdevīga, piemēram, bīstamu ķīmikāliju degradācijai augsnē, ūdenī un gaisā, mikrobioloģisko preparātu ievadīšanai rizosfērā, biopolimēru degradācijai u.c. Pasaulē plaši pētī imobilizētu mikroorganismu izmantošanu vides bioremediācijā. Adhēzija pie organiskiem un neorganiskiem materiāliem ir dabisks process. Noderīgu mikroorganismu imobilizēšanai izmanto dažādus neorganiskus un organiskas dabas materiālus, kā arī šo nesēju visdažādākās fizikālās formas [1-4].

Māli parasti rada mikroorganismiem draudzīgu efektu, bet atsevišķos gadījumos tie var būt antimikrobiāli. Šo īpašību ir iespējams izmantot medicīnā un antimikrobiālu virsmu un būvmateriālu ražošanā. Mālu antimikrobiālā darbība iegūst arvien lielāku praktisko nozīmi, jo nepārtraukti palielinās patogēno baktēriju rezistence pret antibiotikām.

Mūsu pētījumi ir saistīti ar Latvijas māliem un no tiem iegūtām šūnainās keramikas granulām, ar mērķi noteikt testētiem eksperimentāliem paraugiem jaunas pielietošanas jomas medicīnā, vides biotehnoloģijās u.c. Kā viens no galvenajiem kritērijiem turpmākai tehnoloģiju izstrādāšanai

tiek pētīta dažādu mikroorganismu mijiedarbība ar māliem un keramikas materiāliem.

II. VEIKTO PĒTĪJUMU KOPĒJĀ STRATĒGIJA

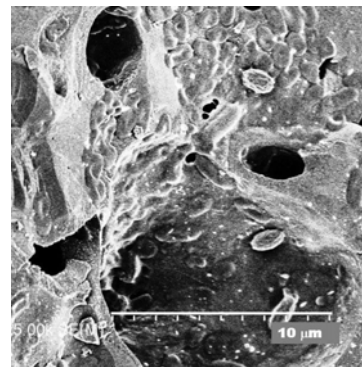
Mūsu darbība VPP projektā sākās ar vides (gaisa, notekūdeņu, augsnes) bioremediācijā potenciāli izmantojamu baktēriju un to asociāciju imobilizēšanu uz dažādām RTU Silikātu materiālu institūta (SMI) zinātnieku izstrādātām un pagatavotām šūnainās keramikas granulām. Vēlāk, pēc mikroorganismu imobilizēšanas, šajā virzienā tika veikta virkne sekmīgu laboratorijas un pilotmēroga eksperimentu augsnes, notekūdeņu un gaisa attīrīšanā no organiskā piesārņojuma (1., 2. att.). Sīkāk izpētīt mālu un keramikas īpatnības, sākām attīstīt arī jaunus virzienus – antimikrobiālās iedarbības izpēti un mālu fizikāli ķīmisko īpašību mikrobioloģisku modificēšanu (3. att.).

III. PROJEKTA IETVAROS IEGŪTIE REZULTĀTI

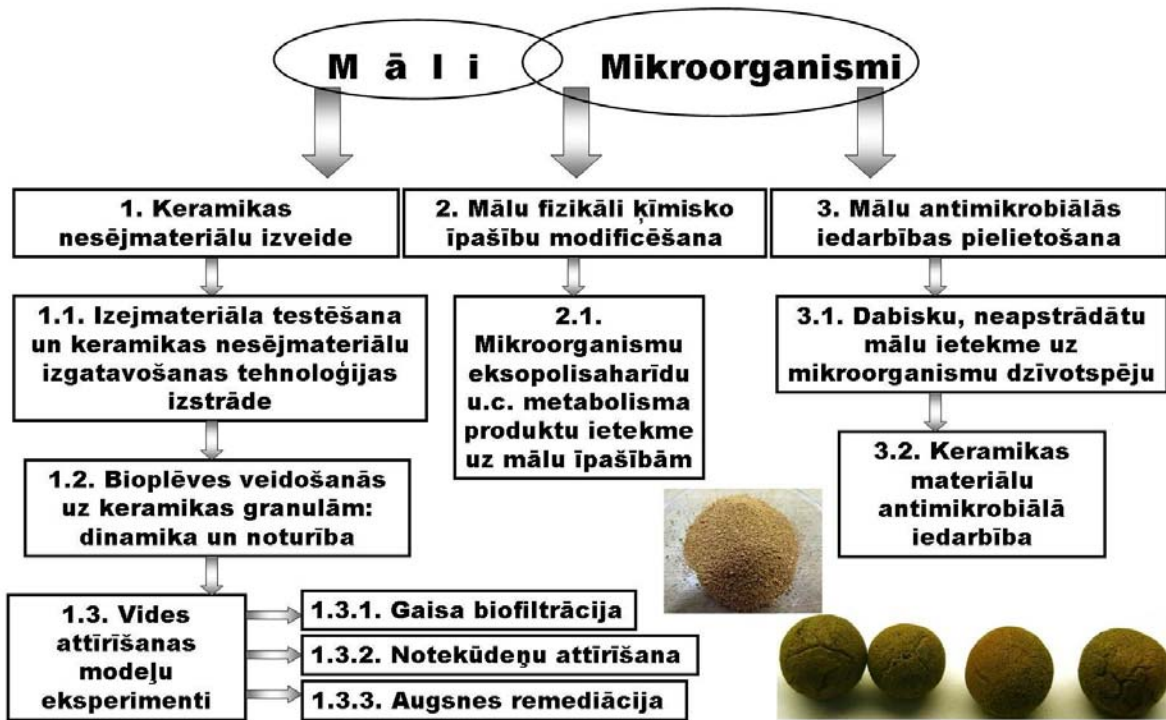
Rezultāti liecina, ka Latvijas māli un no tiem iegūstamie šūnainās keramikas materiāli ir daudzveidīgi, un tādēļ tiem ir plašas un daudzveidīgas pielietošanas iespējas biotehnoloģijā. Veikti pielietojamie pētījumi, un tie iedalāmi trīs virzienos (1. tab.).



1. att. Ar keramzītu pildītas biofiltrācijas kolonnas.



2. att. Uz šūnainās keramikas virsmas imobilizētās baktērijas skenējošajā elektronu mikroskopā.



3.att. 6.apakšprojekta ietvaros veikto pētījumu kopējā stratēģija.

I. TABULA

APAKŠPROJEKTĀ IEGŪTIE GALVENIE REZULTĀTI, TO PUBLICĒŠANA UN IESPĒJAMĀS PIELIETOŠANĀS JOMAS

Pētījuma virziens	Galvenie rezultāti	Rezultātu publicēšana
I. Keramikas nesējmateriālu izveide	<p>1.1. Izejmateriāla testēšana un keramikas nesējmateriālu izgatavošanas tehnoloģijas izstrāde. Sadarbībā ar RTU SMI speciālistiem (Dr. V.Švinka, Dr. R.Švinka) testēja septiņus keramikas granulu paraugus, kuri sastāv no diviem devona māla veidiem, pēc to piemērotības izmantošanai mikroorganismu imobilizācijai. Tika atlasīti trīs varianti, kuri atbilst attiecīgi vienam Liepas sarkano mālu paraugam un diviem Planču mālu paraugiem. Salīdzinot granulu paraugus ar bioplēvi, kura atbilst attiecīgi Liepas sarkano mālu lodēm un puslodēm, mikroorganismu enzimatiskā aktivitāte bija būtiski lielāka uz pusložu virsmas. Secināts, ka keramikas nesēja kvalitāte lielā mērā ir atkarīga no keramikas granulu ražošanas tehnoloģijas, piedevu sastāva un bioplēves veidošanās apstākļiem.</p>	[5-7]
	<p>1.2. Bioplēves veidošanās uz keramikas granulām: dinamika un noturība. Pētīta baktēriju šūnu imobilizācija modeļu eksperimentos ar dažādiem māla materiāliem. Rezultāti liecina, ka keramikas granulu ietekme uz baktērijām ir atkarīga no granulu veida (sastāva, apstrādes temperatūras, virsmas laukuma u.c. īpašībām) un inkubācijas temperatūras. Granulu veids un temperatūra ietekmē arī uz keramikas granulām adsorbēto baktēriju daudzumu. Parādīta baktēriju sorbcijas atkarība no vides pH (optimāls pH 6) un jonu spēka (NaCl koncentrācijas). Parādīta adhēzijas efektivitātes atkarība no baktēriju suspensijas koncentrācijas. Eksperimentos novērota pozitīva korelācija starp vides pH un elektrovadītspēju ūdens vidē ar keramikas granulām. Eksperimentos ar devona perioda Planču mālu keramiku noskaidrots, ka reducētā vidē iegūta keramika nelabvēlīgi ietekmē mikroorganismus, tādēļ imobilizācijai iesakāms gatavot skābekļa vidē apdedzinātus materiālus. Noskaidrots, ka modeļorganisms <i>Pseudomonas putida</i> veido noturīgas bioplēves uz devona perioda māla granulām. Bioplēvju sastāvā baktērijas pēc izžāvēšanas/ dehidratēšanas 20 °C temperatūrā ilgstoši saglabāja dzīvotspēju.</p>	[5, 8-13]
	<p>1.3. Vides attīrīšanas modeļu eksperimenti. Eksperimentos ar baktēriju konsorciju MDK-EKO-7, keramikas granulu paraugam Liepa „S” brūna 1:1 1150 °C bija konstatēta bioplēve uz granulu virsmas ar visaugstāko enzimatisko aktivitāti. Izmantojot projekta 2.posmā konstruētu 5-kolonnu (katras kopējais tilpums 1,58 L) biofiltrācijas modeļu sistēmu, testēja keramikas granulu un organiskā nesēja efektivitāti mikroorganismu imobilizēšanas un gaistošo ogļūdeņražu degradēšanas procesos. Rezultāti liecina par keramikas granulu piemērotību iekļaušanai biofiltrācijas kolonnu nesēja sastāvā, tomēr ir nepieciešami turpmākie pētījumi procesa optimizācijai. Lai pārbaudītu uz keramikas granulām imobilizēto baktēriju aktivitāti piesārņotā augsnē, veica divus gadus ilgu eksperimentu pilota iekārtu mērogā. Eksperimentā salīdzināja variantus ar baktēriju atšķirīgo imobilizācijas metodi uz keramikas granulām. Rezultāti pierādīja, ka imobilizētās baktērijas saglabā dzīvotspēju kā dehidratācijas rezultātā, tā arī ilgstoši atrodoties piesārņotā augsnē, ieskaitot ziemas periodu. No tā izriet, ka šos pētījumus var raksturot kā perspektīvu virzienu augsnes attīrīšanas tehnoloģijas pilnveidošanā.</p>	[14-17]

2. Mālu ķīmisko fizikāli īpašību modifikācija	<p>2.1. Mikroorganismu eksopolisaharīdu u.c. metabolisma produktu ietekme uz mālu īpašībām. Darbā pētīta baktēriju <i>Pseudomonas fluorescens</i> AM-PS11 mijiedarbība ar trim dažādiem Latvijas mālu veidiem un baktēriju eksopolisaharīdu (EPS) ietekme uz mālu plasticitāti, sadarbībā ar RTU SMI speciālistiem (Dr. G.Sedmales vadībā). Konstatēts, ka kvartāra perioda Nīcgales un Lazas māliem piemīt izteiktākas baktēriju augšanu un EPS sintēzi veicinošas īpašības nekā devona perioda Kupravas māliem. Mālu plasticitāte pieaug līdz ar baktēriju sintezēto EPS apjomu. Eksperimenti turpinās.</p>	[18]
3. Mālu antimikrobiālās iedarbības pielietošana	<p>3.1. Dabisku, neapstrādātu mālu ietekme uz mikroorganismu dzīvotspēju. Salīdzināti komerciālie kosmētiskie māli ar trim Latvijas māliem. Analizēts suspensiju pH, mikrobioloģiskais sastāvs un baktēriju sorbcijas spējas. Dažādas izcelsmes neapstrādāti, sausi māli satur nelielu daudzumu nepatogēnu baktēriju, bet nesatur sēnes. Vismazāk mikroorganismu bija zilajos komerciālajos mālos, kam definēta antimikrobiāla aktivitāte, bet visvairāk – Liepas pelēkajos mālos. Mūsu pētījumā redzams, ka Latvijas izcelsmes mālu mikrobioloģiskais sastāvs ir līdzīgs kosmētikā pielietojamo mālu mikrobioloģiskajam sastāvam. Uz neapstrādātiem, sterilizētiem māliem adhezēto baktēriju <i>Pseudomonas putida</i> daudzums bija lielāks nekā uz keramikas materiāliem. Pētītajiem dabiskajiem Latvijas māliem antimikrobiāls efekts netika konstatēts. Neskatoties uz karbonātus saturošo kvartāra perioda Prometeja mālu suspensijas samērā augsto pH un elektrovadītspēju, arī šie neapstrādātie māli ir savietojami ar dzīvām šūnām, ko nevar teikt par Prometeja mālu šūnainās keramikas materiāliem.</p> <p>3.2. Keramikas materiālu antimikrobiālā iedarbība. Pētījumā konstatēts, ka Prometeja mālu keramikas granulām ūdens vidē piemīt baktericīda iedarbība. Tā ir mazāk izteikta Liepas mālu granulām, bet nepiemīt Lodes mālu granulām. Novērota korelācija starp pH un elektrovadītspēju ūdens vidē ar dažādām keramikas granulām. Ir pētīta dažādā temperatūrā apdedzinātu Prometeja mālu keramikas dažāda izmēra frakciju antimikrobiālā aktivitāte. Secināts, ka tā ir ar praktisku nozīmi. Sasmalcinātu Prometeja māla granulā paraugiem konstatēta izteikta baktericīda iedarbība, kuras izcelsme ir saistīta ar ievērojamu pH paaugstināšanos suspensijā, kas iznīcina mikroorganismus. Pētījumi turpinās.</p>	[19-21]

IV. PERSPEKTĪVAS

No iegūtajiem rezultātiem secināts, ka Liepas sarkanie un Planču māli ir piemērots izejmateriāls mikroorganismu nesēja izgatavošanai. Keramikas nesēja kvalitāte lielā mērā ir atkarīga no keramikas granulā ražošanas tehnoloģijas, piedevu sastāva un bioplēves veidošanās apstākļiem. Ir plānots turpināt darbu šajā virzienā jauno tehnoloģiju radīšanai, sadarbībā ar zinātniekiem no RTU. Modeļu eksperimentus ar 5- un 2-kolonnu izveidotajām iekārtām var uzskatīt par starpposmu jauno tehnoloģiju izstrādē, testēšanā un ieviešanā praksē. Atsevišķiem mālu materiāliem tika atklātas antibakteriālas īpašības. Ņemot vērā neorganisko materiālu, tai skaitā šūnainās keramikas, ķīmisko stabilitāti, termoizturību, drošumu lietotājiem un ilgstošu iedarbību, antibakteriālo īpašību izpēte varētu būt jauns turpmāko pētījumu virziens inovatīvu antimikrobiālu produktu izstrādāšanai.

PATEICĪBAS

Pateicamies RTU SMI, LU BF un LU MBI speciālistiem par sekmīgu sadarbību. Pētījumi veikti Valsts pētījumu programmas Nr. 2010.10-4/VPP-5 „Vietējo resursu (zemes dziļi, meža, pārtikas un transporta) ilgtspējīga izmantošana – jauni produkti un tehnoloģijas (NatRes)” projekta „Jaunu tehnoloģiju izstrādāšana inovatīvu produktu radīšanai no Latvijas zemes dziļu resursiem (Zemes dziļes)” ietvaros.

LITERATŪRAS SARAKSTS

- [1] Ozaki, H., Liu, Z., Terashima, Y. Utilization of microorganisms immobilized with magnetic particles for sewage and wastewater treatment. *Water Sci. Technol.*, 1991, vol. 23, p. 1125-1136.
- [2] Koch, B., Ostermann, M., Hoke, H., Hempel, D.-C. Sand and activated carbon as biofilm carriers for microbial degradation of phenols and nitrogen-containing aromatic compounds. *Water Res.*, 1991, vol. 25, p. 1-8. [http://dx.doi.org/10.1016/0043-1354\(91\)90091-4](http://dx.doi.org/10.1016/0043-1354(91)90091-4)
- [3] Loh, K.-C., Chung T.-S., Ang, W.-F. Immobilized-cell membrane bioreactor for high-strength phenol wastewater. *J. Environ. Eng.*, 2000, vol. 126, p. 75-79. [http://dx.doi.org/10.1061/\(ASCE\)0733-9372\(2000\)126:1\(75\)](http://dx.doi.org/10.1061/(ASCE)0733-9372(2000)126:1(75))
- [4] Prieto, M.B., Hidalgo, A., Serra, J.L., Llama, M.J. Degradation of phenol by *Rhodococcus erythropolis* UPV-1 immobilized on Biolite® in a packed-bed reactor. *Journal of Biotechnology*, 2002, vol. 97, p. 1-11. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1656\(02\)00022-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1656(02)00022-6)

- [5] Muter, O., Potapova, K., Nikolajeva, V., Petriņa, Z., Griba, T., Patmalnieks, A., Švinka, R., Švinka, V. Comparative study on bacteria colonization onto ceramic beads originated from two Devonian clay deposits in Latvia. *Scientific Journal of RTU: Material Science and Applied Chemistry*, 2012, vol. 26, p. 134-139.
- [6] Nikolajeva, V., Petriņa, Z., Griba, T., Švinka, V., Cimmers, A. Keramikas granulā un baktēriju mijiedarbības pētījumi. *LU 69. zinātniskās konferences referātu tēzes. Ģeogrāfija, ģeoloģija, vides zinātnes*. 2011., 342.-344. lpp.
- [7] Potapova K., Bērziņš A., Cimmers A., Švinka R., Mutere O. Keramikas materiālu pielietošana vides tehnoloģijās. *LU 69. zinātniskās konferences referātu tēzes. Ģeogrāfija, ģeoloģija, vides zinātnes*. 2011., 360.-362. lpp.
- [8] Nikolajeva, V., Griba, T., Petriņa, Z. Factors influencing adhesion of *Pseudomonas putida* on porous clay ceramic granules. *Environmental and Experimental Biology*, 2012, vol. 10, p. 77-80.
- [9] Griba, T., Nikolajeva, V., Petriņa, Z. Dabīgu mālu mikrobioloģiskais sastāvs un piemērotība baktēriju imobilizēšanai. *LU 70. zinātniskās konferences referātu tēzes. Ģeogrāfija, ģeoloģija, vides zinātnes*. 2012., 165.-168. lpp.
- [10] Nikolajeva, V., Griba, T., Petriņa, Z. Dažādu Latvijas mālu šūnainās keramikas granulā pielietošanas iespējas biotehnoloģijā. *RTU zinātniskie raksti. 1. sēr., Materiālzinātne un lietišķā ķīmija*, 2011., 24. sēj., 106.-109. lpp.
- [11] Neibergs, M., Griba, T., Berzina, L. Colonization of ceramic supports by artificial bacterial associations. 18th Int. Conf. „EcoBalt 2013”, October 25-27, 2013, Vilnius, Lithuania.
- [12] Griba, T., Petriņa, Z., Nikolajeva, V. Influence of environmental factors on the attachment of *Pseudomonas putida* on Devonian clay porous ceramic granules. 1st Congress of Baltic Microbiologists, October 31 – November 4, 2012, Riga, p. 50.
- [13] Griba, T., Petriņa, Z., Nikolajeva, V. Immobilization of *Pseudomonas putida* on ceramic granules for environmental bioremediation. 17th Int. Conf. "EcoBalt 2012", October 18-19, 2012, Riga, p. 28.
- [14] Bērziņš, A., Potapova, K., Strikauska, S., Muter, O. Combination of straw and ceramic materials for biofiltration of volatile hydrocarbons. *Scientific Journal of RTU: Materials Sciences and Applied Chemistry*, 2012, vol. 26, p. 127-133.
- [15] Muter, O., Mihailova, A., Berzins, A., Gavare, M., Grube, M., Strikauska, S. Comparative study of ammonium biodegradation in biofiltration columns using different operating and feeding modes. 18th Int. Conf. „EcoBalt 2013”, October 25-27, 2013, Vilnius, Lithuania.
- [16] Berzins, A., Berzina, L., Strikauska, S., Svinka, R., Svinka, V., Muter, O. Treatment of phosphorous- and nitrogen-containing synthetic wastewaters in the cascade of ceramics-packed columns. 18th Int. Conf. „EcoBalt 2013”, October 25-27, 2013, Vilnius, Lithuania.
- [17] Muter, O., Berzins, A., Potapova, K., Strikauska, S., Stelmahere, S. Bacteria immobilization on ceramic beads for soil remediation technologies. *Journal of International Scientific Publications: Ecology & Safety* (ISP: EB) ISSN: 1313-2563, 2011, vol. 5, p. 152-162.

- [18] **Vecstaudza, D., Rundans, M., Muter, O., Sedmale, G.** Evaluation of biotechnological potential of culture *Pseudomonas fluorescens* AM-PS11 to modify properties of Latvian Devonian and Quaternary clay. 18th Int. Conf. „EcoBalt 2013”, October 25-27, 2013, Vilnius, Lithuania.
- [19] **Nikolajeva, V., Griba, T., Petrina, Z.** Application possibilities of different expanded Latvian clay granules in biotechnology. *Scientific Journal of RTU: Material Science and Applied Chemistry*, 2011, vol. 24, p. 106-109.
- [20] **Gribo, T., Petriņa, Z., Nikolajeva, V., Karasa, J.** Dabīgu, termiski un ķīmiski apstrādātu mālu antibakteriālā aktivitāte. *LU 71. zinātniskās konferences referātu tēzes. Ģeogrāfija. Ģeoloģija. Vides zinātne*. 2013., 303.-305. lpp.
- [21] **Petrina, Z., Gribo, T., Nikolajeva, V.** Potential applications of porous materials from Devonian and Quaternary clay deposits of Latvia for biotechnological purposes. 1st Congress of Baltic Microbiologists, October 31 – November 4, 2012, Riga, p. 49.

Olga Muter, Dr. biol., senior researcher
Institute of Microbiology & Biotechnology, University of Latvia
Address: 4 Kronvalda blvd., Riga LV-1010, Latvia
E-mail: olga.mutere@lu.lv
Member of the Microbiological Society of Latvia

Vizma Nikolajeva, Dr. biol., docent, senior researcher
Faculty of Biology, University of Latvia
Address: 4 Kronvalda blvd., Riga LV-1010, Latvia
E-mail: vizma.nikolajeva@lu.lv
Member of the Microbiological Society of Latvia

Olga Muter, Vizma Nikolajeva. Application of Latvian Clay in Biotechnologies: Results and Perspectives

Microbiology and biotechnology are considered to be traditional fields for fundamental and applied research in Latvia. The State Research Programme No. 2010.10-4/VPP-5 NatRes on the long-term use of the local resources supports investigations focused on the novel biotechnological products and technologies based on ceramic materials. The aim of our study is to test the experimental samples of clay and ceramic beads for determining the new prospective fields for their application in medicine, environmental biotechnology, etc. One of the most important criteria for further technology development is the study on interrelations of different microorganisms with clay and ceramics. Research on ceramic carriers is divided into 3 parts, i.e.: 1) testing of raw material and development of the technology for fabrication of ceramic carriers; 2) biofilm formation onto the surface of ceramic carrier: dynamics and stability; 3) model experiments in the field of environmental biotechnology. Besides, modification of physical and chemical properties of clay treated with microorganisms is studied. Furthermore, within the framework of this Project, an additional prospective direction for further research has been generated, i.e., investigation on antimicrobial properties of natural raw clay and ceramic materials. This paper summarizes the main results obtained in the period from 2010 to 2013, as well as suggests some new prospective directions for further research.

Ольга Мутер, Визма Николаева. Использование глины месторождений Латвии в биотехнологиях: результаты и перспективы

Микробиология и биотехнология являются традиционными направлениями фундаментальных и прикладных исследований в Латвии. Государственная Исследовательская Программа 2010.10-4/VPP-5 NatRes по долгосрочному использованию местных ресурсов финансирует исследования по новым биотехнологическим продуктам и технологиям на основе керамзита. В наших экспериментах тестируются экспериментальные образцы глины и произведённых из неё керамических гранул, с целью определения новых областей их применения в медицине, биотехнологиях окружающей среды и др. Одним из основных критериев дальнейшей разработки технологий является изучение взаимодействия различных микроорганизмов с глиной и керамикой. Исследования по разработке керамических носителей состоят из 3 подразделов: 1) тестирование исходного материала и разработка технологии изготовления керамического носителя; 2) образование биоплёнки на поверхности керамических гранул: динамика и устойчивость; 3) модельные эксперименты по очистке окружающей среды. Кроме того, рассматривается возможность модификации физико-химических свойств глины под влиянием микроорганизмов. В процессе работы сформировалось дополнительное перспективное направление исследований, а именно – изучение антимикробных свойств природной необработанной глины и керамических материалов. В данной статье обобщены главные результаты, полученные в период с 2010 по 2013 гг., а также намечены перспективные направления для дальнейших исследований.