

ЗАСТОСУВАННЯ БІОСУРФАКТАНТІВ У ТЕХНОЛОГІЇ БІОФІЛЬТРАЦІЇ СТІЧНИХ ВОД З ВИКОРИСТАННЯМ *DAPHNIA MAGNA*

Л.В. ХУДА¹, О.Е. ФРУНЗА², О.В. КАРПЕНКО³, В.І. ЛУБЕНЕЦЬ⁴, О.О. ХУДИЙ¹

¹Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича, вул. Коцюбинського 2, м. Чернівці, 58012
e-mail: l.khuda@chnu.edu.ua

²Управління Державного агентства меліорації та рибного господарства у Чернівецькій області
вул. Шептицького 2, м. Чернівці, 58000
e-mail: olga.grinko155@ukr.net

³Відділення фізико-хімії горючих копалин Інституту фізико-органічної хімії і вуглехімії ім. Л.М. Литвиненка
НАН України, вул. Наукова, 3а, м. Львів, 79060
e-mail: e.v.karpenko@gmail.com

⁴Національний університет «Львівська політехніка» вул. С. Бандери 12, м. Львів, 79013
e-mail: v.lubenets@gmail.com

При вирішенні задач очищення води, в тому числі для потреб індустриального рибництва, особливої уваги заслуговують методи біофільтрації за участі планктонних організмів, зокрема гіллястовусих ракоподібних. Специфічний фільтраційний апарат живлення дафній може забезпечити високоефективне очищення стічних вод від завислих дрібнодисперсних частинок, які мають низьку швидкість осідання та погано затримуються на механічних фільтрах. Важливою перевагою даного способу очищення водою є можливість використання отриманої біомаси зоопланктону як живого корму для вирощування риб. Підвищити фільтраційні властивості зоопланктону можна шляхом його вирощування у присутності поверхнево-активних речовин біологічного походження, які, окрім того, забезпечують покращення засвоєваності корму кладощами нутрієнтів та інтенсифікують нарощення їх біомаси. В даному дослідженні було оцінено можливість застосування препарату трегалозоліпідних біоПАР, отриманого з культуральної рідини *Rhodococcus erythropolis* AU-1, для інтенсивного нарощення культури *Daphnia magna* з метою здійснення біологічної очистки водою. Встановлено, що токсичність трегалозоліпідів має дозозалежний характер, зокрема, їх мінімальна концентрація, при якій спостерігалась загибель дафній протягом 24 годин впливу, склала 300 мг/л, а LC_{50} при тій же тривалості дії – 479 мг/л. Максимальна нетоксична концентрація препарату трегалозоліпідних біоПАР складає 200 мг/л. Концентрації трегалозоліпідів в діапазоні 1-3 мг/л забезпечують зростання щільності культури дафній у 1,3-1,7 рази у порівнянні з контролем. Для оцінки ефективності біофільтрації *Daphnia magna* в модельному експерименті була використана вода з механічного фільтру експериментальної рециркуляційної системи ЧНУ імені Юрія Федьковича. Величина оптичної щільності скидної води вже через одну добу перебування в ній дафній зменшується більше як удвічі, а через 4 доби – у 7 разів. Додавання біоПАР призводить до більш ефективного процесу фільтрації, при цьому найкращі показники встановлено при використанні препарату з концентрацією 1 мг/л. Застосування біоПАР в концентрації 1, 2 та 3 мг/л призводить до зниження величини електропровідності та загальної мінералізації у порівнянні з контролем. При цьому показники рН та вмісту розчинного кисню у порівнянні з контролем змін не зазнають.

Ключові слова: поверхнево-активні речовини, трегалозоліпіди, *Daphnia magna*, біологічне очищення, стічні води.

Вступ. Проблема мінімізації органічних забруднень від сільськогосподарських підприємств, в тому числі аквакультурних господарств, є стимулом для розвитку біоремедіаційних досліджень. Серед різних методів очищення стічних вод, поряд з традиційними фізико-хімічними методами, активно використовуються технології біологічного очищення, здебільшого із застосуванням аеротенків з активним мулом (Саблій, 2013). Поряд з цим, при вирішенні задач очищення води, в тому числі для потреб індустриального рибництва, особливої уваги

заслуговують методи біофільтрації за участі планктонних організмів, зокрема гіллястовусих ракоподібних. Специфічний фільтраційний апарат живлення дафній може забезпечити високоефективне очищення стічних вод від завислих дрібнодисперсних частинок, які мають низьку швидкість осідання та погано затримуються на механічних фільтрах (Pau et al., 2013; Serra et al., 2022). Важливою перевагою даного способу очищення водою є можливість використання отриманої біомаси зоопланктону як живого корму для вирощування риб (Khudiy et al., 2016; Nyman et al., 2021). Підвищити фільтраційні

властивості зоопланктону можна шляхом його вирощування у присутності біосурфактантів – поверхнево-активних речовин біологічного походження. Біосурфактанти синтезуються мікроорганізмами, вони є малотоксичними у порівнянні з хімічними ПАР та біодеградабельними (Mir et al., 2017). Окрім того, застосування біоПАР дозволяє підвищити засвоюваність кладоцерами нутрієнтів та інтенсифікувати нарощення їх біомаси.

Перспективним продуцентом ПАР є *Rhodococcus erythropolis*, який здатний до синтезу трегалозоліпідних поверхнево-активних сполук (Корецька та ін., 2018). Дані мікроорганізми використовуються в біоремедіаційних технологіях, оскільки забезпечують біодеградацію толуолу, нафталену, біфенілу та інших циклічних органічних сполук (Dockuy et al., 2018). Проте, застосування таких речовин вимагає попереднього проведення процедури біотестування.

Отже, метою даного дослідження було оцінити можливість застосування трегалозоліпідних біоПАР для інтенсивного нарощення культури *Daphnia magna* з метою здійснення біологічної очистки водойм.

Матеріали та методи. Утримання лабораторної культури *Daphnia magna* проводили в умовах кліматичної кімнати із стабільним терморежимом $+20 \pm 1^\circ\text{C}$ та тривалістю світлового дня 16 годин. Проводили визначення показників рівня гострої токсичності для різних концентрацій препарату трегалозоліпідних біоПАР, отриманого з культуральної рідини *Rhodococcus erythropolis* AU-1 у відділенні фізико-хімії горючих копалин Інституту фізико-органічної хімії і вуглехімії ім. Л.М. Литвиненка НАН України.

Початкова щільність культури дафній складала 100 особин/л. Мертвих та живих особин підраховували протягом першої години дослідження, надалі через 24 та 48 годин експерименту за допомогою лічильної камери Богорова під бінокулярним мікроскопом МБС-9. Визначення LK_{50} на 24 та 48 години проводили з використанням пробіт-аналізу (ДСТУ 4173:2003, 2004). Протягом експерименту тварин не годували.

Для інтенсифікації нарощення біомаси *D. magna* готували культиватійні середовища з концентрацією трегалозоліпідного препарату 1 мг/л, 2 мг/л та 3 мг/л. Як контроль використовували культури дафній, у середовищі вирощування яких біоПАР не було. Як скидну воду використовували воду з механічного фільтра рециркуляційної системи для вирощування риби,

в яку поміщали дафній. Дослідження проводили протягом 4 діб.

Для оцінки ефективності очищення визначали оптичну густину скидної води на фотоелектроколориметрі КФК-2 (530 нм), рН, електропровідність, загальну мінералізацію та вміст розчинного кисню у воді – приладом для визначення фізико-хімічних показників води IP67 Combo. Отримані результати обраховували статистично з використанням критерію Стьюдента.

Результати та їх обговорення. Результати проведеного аналізу з визначення гострої токсичності трегалозоліпідів з використанням тестових культур *Daphnia magna* засвідчив доволі низький рівень токсичності досліджуваних речовин. Так, мінімальна концентрація трегалозоліпідів, при якій спостерігалась загибель дафній протягом 24 годин впливу склала близько 300 мг/л, а концентрація, при якій гинула половина особин тестової культури протягом 24 годин – 479 мг/л (рис. 1).

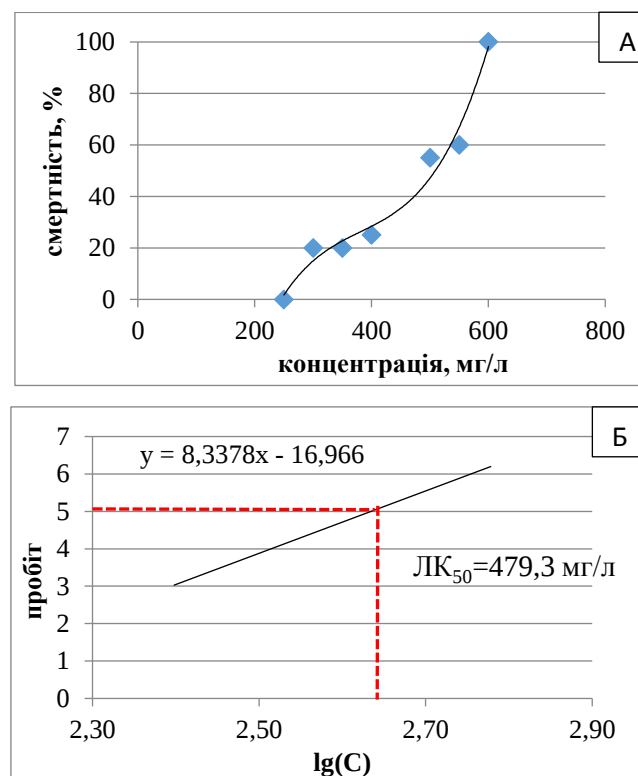


Рис. 1. Залежність величини смертності *Daphnia magna* протягом 24 год при дії різних концентрацій трегалозоліпідів (А) та їх LK_{50} (Б)

Fig. 1. Dependence of the mortality rate of *Daphnia magna* during the 24 h under the influence of different concentrations of trehalosolipids (A) and their LK_{50} (B)

При збільшенні інкубації до 48 годин LK_{50} знизилась всього на 27%, порівняно з LK_{50} для 24 год та склала 347 мг/л (рис. 2). При концентраціях

трегалозоліпідів до 250 мг/л загибелі дафній протягом 48 годин не спостерігалось.

Надвисоку токсичність, за якої гине 100% особин протягом 24 годин, трегалозоліпідні біоПАР проявляють при досить високих концентраціях – 600 мг/л та вище. Очевидно, такі концентрації використовувати в аквакультурній практиці не варто.

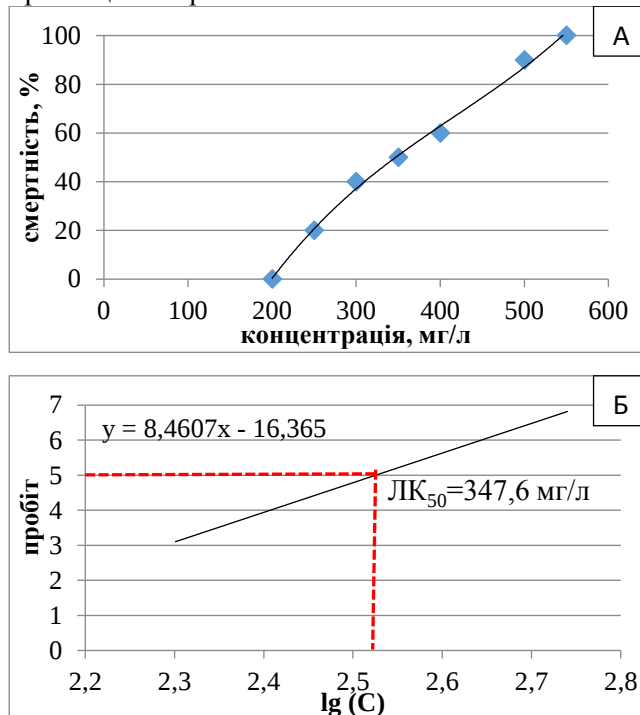


Рис. 2. Залежність величини смертності *Daphnia magna* протягом 48 год при дії різних концентрацій трегалозоліпідів (А) та їх LC_{50} (Б)

Fig. 2. Dependence of the mortality rate of *Daphnia magna* during the 48 h under the influence of different concentrations of trehalosolipids (A) and their LC_{50} (B)

Враховуючи ці результати, для ефективного нарощення біомаси дафній нами були обрані концентрації трегалозоліпідних біоПАР 1 мг/л, 2 мг/л та 3 мг/л. Встановлено, що застосування усіх трьох досліджуваних концентрацій трегалозоліпідів позитивно впливало на кількість особин *Daphnia magna*. Так, найбільша щільність культур дафній у дослідних групах була у 1,3-1,7 разів вищою у порівнянні з контрольною групою (рис. 3).

Максимальна кількість особин була відмічена для культури дафній, які зазнавали впливу трегалозоліпідів у найменшій з досліджуваних концентрацій – 1 мг/л. Проте, вищі концентрації препарату забезпечували швидше наростання кількості особин. Зокрема, при концентраціях 2 та 3 мг/л щільність культур *Daphnia magna* вже на 6-ту добу експерименту була в 1,5 рази більшою, ніж в першій та контрольній групах.

Після підбору оптимальних концентрацій біоПАР на наступному етапі досліджень для оцінки ефективності біофільтрації *Daphnia magna* була використана вода з механічного фільтру експериментальної рециркуляційної системи ЧНУ імені Юрія Федьковича. Ця вода насичується органікою внаслідок життєдіяльності риб та за рахунок вимивання її з кормів. Відповідно, її також можна використовувати як альтернативне середовище для культивування кормового зоопланктону.

Максимальна кількість особин була відмічена для культури дафній, які зазнавали впливу трегалозоліпідів у найменшій з досліджуваних концентрацій – 1 мг/л. Проте, вищі концентрації препарату забезпечували швидше наростання кількості особин. Зокрема, при концентраціях 2 та 3 мг/л щільність культур *Daphnia magna* вже на 6-ту добу експерименту була в 1,5 рази більшою, ніж в першій та контрольній групах.

Після підбору оптимальних концентрацій біоПАР на наступному етапі досліджень для оцінки ефективності біофільтрації *Daphnia magna* була використана вода з механічного фільтру експериментальної рециркуляційної системи ЧНУ імені Юрія Федьковича. Ця вода насичується органікою внаслідок життєдіяльності риб та за рахунок вимивання її з кормів. Відповідно, її також можна використовувати як альтернативне середовище для культивування кормового зоопланктону.

Встановлено, що особини дафній активно знижують величину оптичної густини скидної води протягом 4-денного перебування в ній без додаткового підгодовування, що вказує на ефективність їх використання як фільтраторів (рис. 4).

Так, величина оптичної щільності скидної води вже через одну добу перебування в ній дафній зменшується більше як удвічі, а через 4 доби – у 7 разів. Додавання біоПАР призводить до більш ефективного процесу фільтрації, при цьому найкращі показники встановлено при використанні препарату з концентрацією 1 мг/л.

Результати дослідження рівня загальної мінералізації та електропровідності (рис. 5) оборотної води з рециркуляційної системи вказують на зниження цих показників за умов застосування усіх досліджуваних концентрацій біоПАР, що вказує на активацію фільтраційних властивостей дафній за умов їх застосування. Натомість, практично не зазнають змін у порівнянні з контролем показники рН та вмісту розчинного кисню.

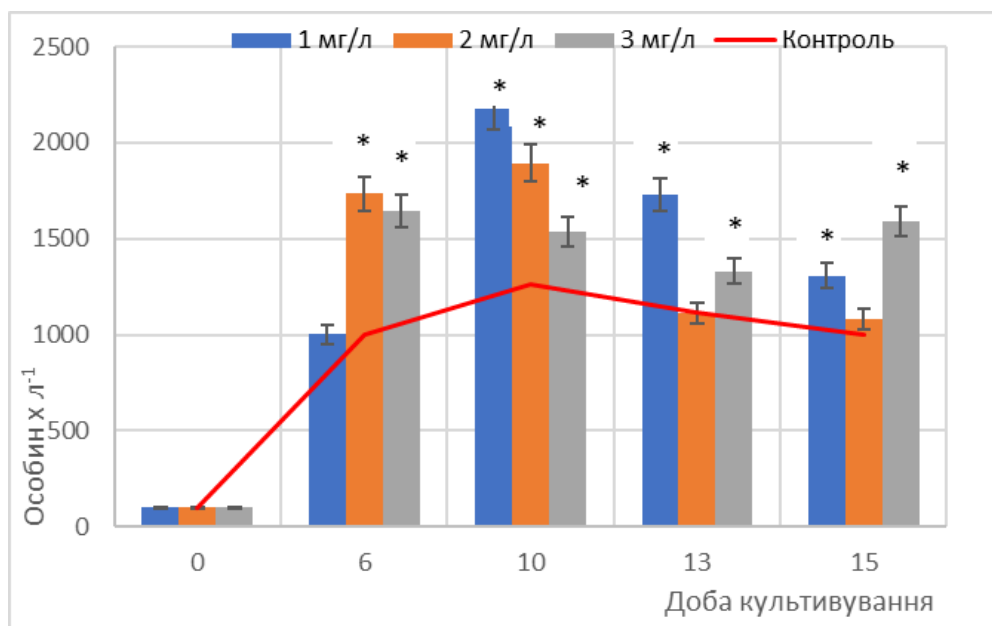


Рис. 3. Динаміка щільності культур *Daphnia magna* за дії різних концентрацій трегалозоліпідів

Примітка (тут і надалі): * - різниця з контролем статистично достовірна ($p \leq 0,05$).

Fig. 3. Density dynamics of *Daphnia magna* cultures under the influence of different concentrations of trehalosolipids

Note (hereinafter): * - difference with the control is statistically significant ($p \leq 0.05$).

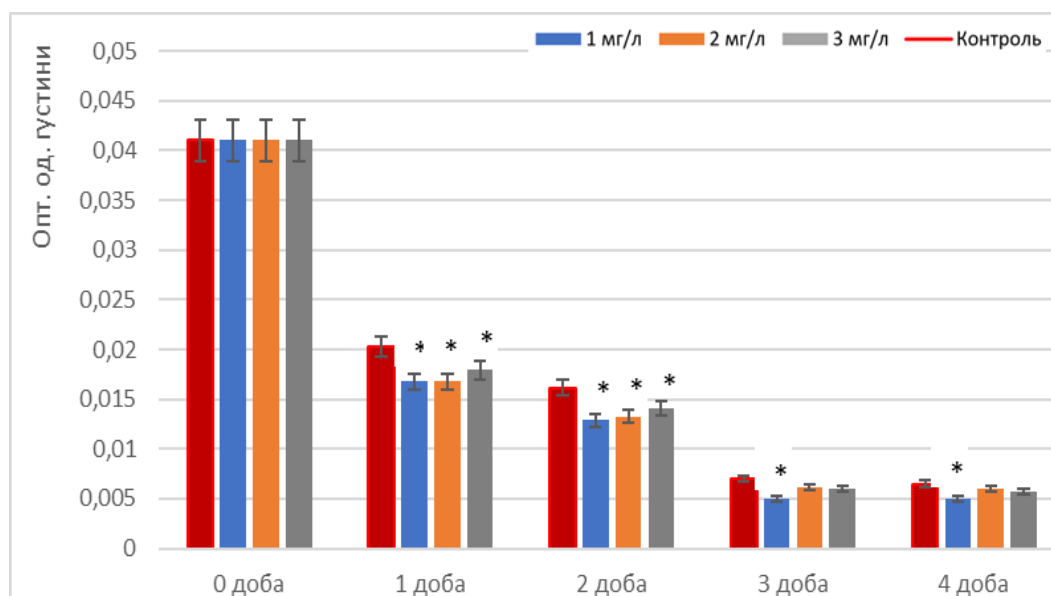


Рис. 4. Динаміка оптичної густини скидної води з *Daphnia magna* за дії різних концентрацій трегалозоліпідів

Fig. 4. Dynamics of the optical density of discharge water with *Daphnia magna* under the influence of different concentrations of trehalosolipids

Впродовж культивування дафній спостерігається поступове зростання величини рН скидної води, яке сягає максимальних значень (7,7 для контролю, 7,5-7,6 – для дослідних груп) на 2-гу добу експерименту. Вміст розчинного кисню поступово знижується як в контролі, так і в досліді від 6,9 мг/л до 5,3 мг/л.

Отже, показана можливість інтенсифікації нарощення біомаси дафній за умов застосування препарату трегалозоліпідних біоПАР в діапазоні концентрацій 1-3 мг/л. Відмічено посилення фільтраційної активності культури *Daphnia magna* при використанні препарату з концентрацією 1 мг/л.

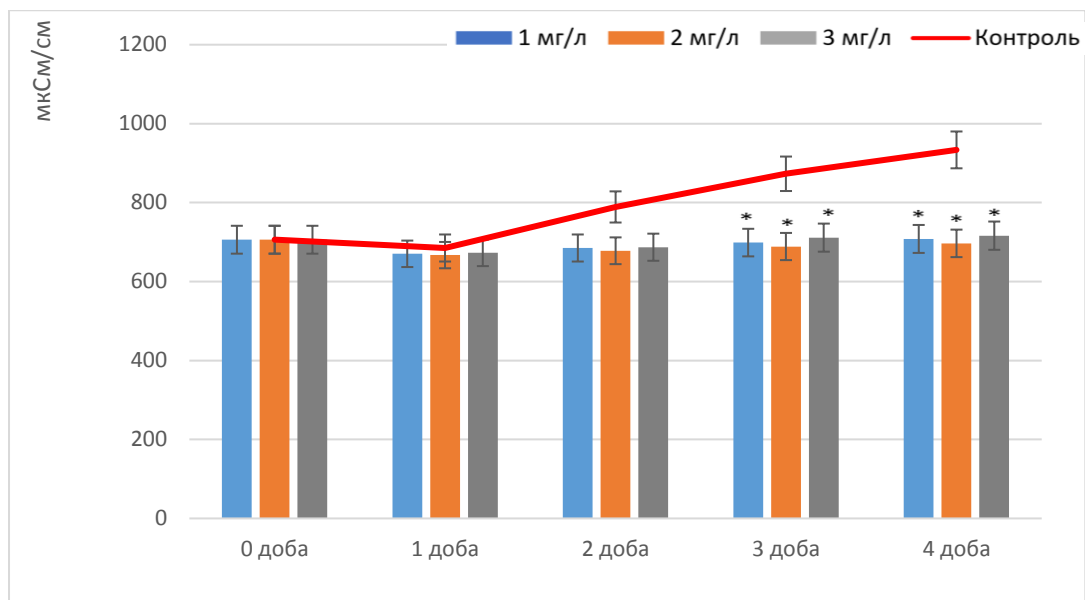


Рис. 5. Рівень електропровідності скидної води з *Daphnia magna* за дії різних концентрацій трегалозоліпідів

Fig. 5. Electrical conductivity level of *Daphnia magna* discharge water under the influence of different concentrations of trehalosolipids

Висновки. Максимальна нетоксична концентрація препарату трегалозоліпідних біоПАР складає 200 мг/л. Концентрації трегалозоліпідів в діапазоні 1-3 мг/л забезпечують зростання щільності культури дафній у 1,3-1,7 рази у порівнянні з контролем.

Величина оптичної щільності скидної води вже через одну добу перебування в ній дафній зменшується більше як удвічі, а через 4 доби – у 7 разів. Додавання біоПАР призводить до більш

ефективного процесу фільтрації, при цьому найкращі показники встановлено при використанні препарату з концентрацією 1 мг/л. Застосування біоПАР в концентрації 1, 2 та 3 мг/л призводить до зниження величини електропровідності та загальної мінералізації у порівнянні з контролем. При цьому показники рН та вмісту розчинного кисню у порівнянні з контролем змін не зазнають.

Список літератури:

1. ДСТУ 4173:2003 Якість води. Визначення гострої летальної токсичності на *Daphnia magna* Straus та *Ceriodaphnia affinis* Lilljeborg (Cladocera, Crustacea). (ISO 6341:1996, MOD). Київ: Держспоживстандарт України, 2004. 17 с.
2. Корецька Н.І., Мідяна Г.Г., Карпенко О.В. Оптимізація екстракції трегалозоліпідних поверхнево-активних речовин штаму *Rhodococcus erythropolis* AU-1. *Innov Biosyst Bioeng*. 2018; 2(4): 246-251. <https://doi.org/10.20535/ibb.2018.2.4.148935>
3. Саблій Л.А. Фізико-хімічне та біологічне очищення висококонцентрованих стічних вод. Рівне: НУВГП. 2013. – 291 с.
4. Dockyu Kim, Ki Young Choi, Miyoung Yoo, Gerben J Zylstra, Eunbin Kim. Biotechnological Potential of *Rhodococcus* Biodegradative Pathways. *J Microbiol Biotechnol*. 2018; 28(7):1037-1051. <https://doi.org/10.4014/jmb.1712.12017>
5. Hyman M., Wang Q., Wilson A., Adhikari S., Higgins B. Production of *Daphnia* zooplankton on wastewater-grown algae for sustainable conversion of waste nutrients to fish feed. *Journal of Cleaner Production*. 2021; 310: 12750. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.127501>
6. Khudiyi O., Marchenko M., Cheban L., Khuda L., Kushniryk O., Malishchuk I. Recirculating aquaculture systems waste water as a medium for increase of phytoplankton and zooplankton biomass. *International Letters of Natural Sciences*. 2016; 54: 1–7. <https://doi.org/10.18052/www.scipress.com/ILNS.54.1>
7. Mir Sh, Jamal P, Alama MdZ, Mir AB, Ansari AH. Microbial surface tensio-active compounds: production and industrial application perspectives: a review. *Int J Biotech Bioeng*. 2017; 3(8):282-301. <https://doi.org/10.25141/2475-3432-2017-8.0273>
8. Pau C., Serra T., Colomer J., Casamitjana X., Lluís S., Ruud K. Filtering capacity of *Daphnia magna* on sludge particles in treated wastewater. *Water Research*. 2013; 47: 181–186. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.09.047>
9. Serra T., Barcelona A., Pous N., Salvadó V., Colomer J. Disinfection and particle removal by a nature-based *Daphnia* filtration system for wastewater treatment. *Journal of Water Process Engineering*. 2022; 50: 103238. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2022.103238>
10. Shiny K.J., Remani K.N., Nirmala E., Jalaja T.K., Sasidharan V.K. Biotreatment of wastewater using

aquatic invertebrates, *Daphnia magna* and *Paramecium caudatum*. *Bioresource Technology*. 2005; 96: 55–58. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.01.008>

References:

1. SSU 4173:2003 Water quality. Determination of acute lethal toxicity on *Daphnia magna* Straus and *Ceriodaphnia affinis* Lilljeborg (Cladocera, Crustacea). Kyiv: Derzhspozhyvstandart Ukrainy, 2004. 17 p.
2. Koretska N.I., Midyana H.H., Karpenko O.V. Optimization of trehalose lipids extraction – metabolites of *Rhodococcus erythropolis* AU-1. *Innov Biosyst Bioeng*. 2018; 2(4): 246-251. <https://doi.org/10.20535/ibb.2018.2.4.148935>
3. Sabliy L.A. Physical, chemical and biological treatment of highly concentrated wastewater. Rivne: NUWGP. 2013. – 291 p.
4. Dockyu Kim, Ki Young Choi, Miyoun Yoo, Gerben J Zylstra, Eungbin Kim. Biotechnological Potential of *Rhodococcus* Biodegradative Pathways. *J Microbiol Biotechnol*. 2018; 28(7):1037-1051. <https://doi.org/10.4014/jmb.1712.12017>
5. Hyman M., Wang Q., Wilson A., Adhikari S., Higgins B. Production of *Daphnia* zooplankton on wastewater-grown algae for sustainable conversion of waste nutrients to fish feed. *Journal of Cleaner Production*. 2021; 310: 12750. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.127501>
6. Khudiy O., Marchenko M., Cheban L., Khuda L., Kushniryk O., Malishchuk I. Recirculating aquaculture systems waste water as a medium for increase of phytoplankton and zooplankton biomass. *International Letters of Natural Sciences*. 2016; 54: 1–7. <https://doi.org/10.18052/www.scipress.com/ILNS.54.1>
7. Mir Sh, Jamal P, Alama MdZ, Mir AB, Ansari AH. Microbial surface tensio-active compounds: production and industrial application perspectives: a review. *Int J Biotech Bioeng*. 2017; 3(8):282-301. <https://doi.org/10.25141/2475-3432-2017-8.0273>
8. Pau C., Serra T., Colomer J., Casamitjana X., Lluís S., Ruud K. Filtering capacity of *Daphnia magna* on sludge particles intreated wastewater. *Water Research*. 2013; 47: 181–186. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.09.047>
9. Serra T., Barcelona A., Pous N., Salvadó V., Colomer J. Disinfection and particle removal by a nature-based *Daphnia* filtration system for wastewater treatment. *Journal of Water Process Engineering*. 2022; 50: 103238. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2022.103238>
10. Shiny K.J., Remani K.N., Nirmala E., Jalaja T.K., Sasidharan V.K. Biotreatment of wastewater using aquatic invertebrates, *Daphnia magna* and *Paramecium caudatum*. *Bioresource Technology*. 2005; 96: 55–58. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.01.008>

APPLICATION OF BIOSURFACTANTS IN WASTEWATER BIOFILTRATION TECHNOLOGY USING DAPHNIA MAGNA

L.V. Khuda, O.E. Frunza, O.V. Karpenko, V.I. Lubenets, O.O. Khudiy

When solving water purification problems, including for the needs of industrial fish farming, biofiltration methods involving planktonic organisms, in particular branchiopod crustaceans, deserve special attention. A specific filtration apparatus feeding daphnia can provide highly efficient wastewater treatment from suspended fine particles that have a low settling velocity and are not able to be retained on mechanical filters. An important advantage of this method of water treatment is the ability to use the resulting zooplankton biomass as live feed for fish farming. The filtration properties of zooplankton can be improved by growing it in the presence of surfactants of biological origin, which, in addition, improve the absorption of nutrients by cladocerans and intensify their growth. In this study, the possibility of using a preparation of trehalosolipid biosurfactants obtained from the culture fluid of *Rhodococcus erythropolis* AU-1 for intensive growth of *Daphnia magna* culture for the purpose of biological treatment of water bodies was evaluated. It was established that the toxicity of trehalosolipids is dose-dependent, in particular, their minimum concentration at which the death of daphnia was observed within 24 hours of exposure was 300 mg/l, and the LC50 at the same duration of exposure was 479 mg/l. The maximum non-toxic concentration of the trehalosolipid biosurfactant is 200 mg/l. Concentrations of trehalosolipids in the range of 1-3 mg/l provide an increase in the density of daphnia culture by 1.3-1.7 times compared to the control. To evaluate the efficiency of biofiltration of *Daphnia magna* in the model experiment, water from the mechanical filter of the experimental recirculation system of the Yuriy Fedkovych Chernivtsi National University was used. The value of the optical density of the discharge water decreases by more than half after one day of daphnia presence in it, and after 4 days - by 7 times. The addition of biosurfactants leads to a more efficient filtration process, with the best results obtained when using the preparation with a concentration of 1 mg/l. The use of biosurfactants in concentrations of 1, 2 and 3 mg/l leads to a decrease in electrical conductivity and total mineralization compared to the control. At the same time, the pH and soluble oxygen content did not change compared to the control.

Keywords: surfactants, trehalosolipids, *Daphnia magna*, biological treatment, wastewater.

Отримано редколегією 22.05.2023 р.