

## **ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПРОМЫШЛЕННЫХ ОТХОДОВ С ЦЕЛЬЮ ПОЛУЧЕНИЯ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ *RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS* ЕК-1**

**Пирог Т.П., д-р биол. наук, профессор, Морозова А.П., аспирант, Кундеев М.Д., студент  
Национальный университет пищевых технологий, г. Киев**

*Показана возможность использования отходов пищевых производств (меласса и жиросодержащие отходы), а также побочного продукта производства биодизеля (глицерина) в качестве субстратов для производства поверхностно-активных веществ (ПАВ). Установлено, что ПАВ синтезированные бактериями *Rhodococcus erythropolis* интенсифицируют процессы деструкции нефти в загрязненной воде и почве. На 30 сутки степень очистки воды (2,6 г нефти/л воды) составляла 83-92 %, а почвы (21,4 г нефти/кг почвы) – 51-86 %.*

*The possibility of using of food industry wastes (molasses and oil containing wastes) and byproduct of biodiesel production (glycerol) as substrates for surface-active substances (SAS) synthesis was shown. It was*

determined that SAS produced by *Rhodococcus erythropolis* intensify the processes of oil destruction in contaminated water and soil. After 30 days the oil destruction level in water (2.6 g oil/l water) was 83-92 % and in soil (21.4 g oil/kg soil) – 51-86 %.

Ключевые слова: поверхностно-активные вещества, отходы производств, деструкция нефти.

Процессы добытия, транспортировки и переработки нефти постоянно сопровождаются технологическими и аварийными выбросами сырья в окружающую среду, что приводит к загрязнению и нарушениям различной тяжести в экосистемах. Особенную опасность представляют аварии на нефтепроводах. Это обусловлено сложностями в организации эффективной защиты окружающей среды по всей длине магистралей. В результате таких выбросов нефтяные загрязнения вызывают колоссальную нагрузку на природные системы, в результате чего их быстрая деградация нефтеокисляющей микрофлорой становится невозможной. Попадая в почву и воду, большие количества нефтепродуктов нарушают экологическое равновесие систем, это проявляется в ингибировании жизнедеятельности большинства групп микроорганизмов за счет угнетения ферментативной активности [6].

Еще одной глобальной проблемой являются отходы различных производств такие как, например, отходы производства масла и жиров (фузы), сахара (меласса), а также большие количества отработанного (пережаренного) подсолнечного масла, которое используется в учреждениях общественного питания. В результате производства биодизеля из растительного сырья как побочный продукт в большом количестве образуется глицерин, который в дальнейшем не находит широкого применения [8].

Рациональный подход к утилизации отходов заключается в уменьшении их количества, повторном использовании и переработке с целью получения практически ценных продуктов, в том числе и микробного синтеза.

Уникальные особенности микробных поверхностно-активных веществ (ПАВ) обуславливают их использование в различных отраслях промышленности вместо химически-синтезированных аналогов. ПАВ микробного происхождения используют в нефтедобывающей, химической, фармацевтической, пищевой промышленности, сельском хозяйстве, а также для очистки окружающей среды от углеводородов и тяжелых металлов [6, 7]. Но рациональность использования ПАВ микробного происхождения зависит в первую очередь от экономической эффективности их производства. Одним из способов удешевления технологий микробных ПАВ является использование дешевых ростовых субстратов, например, отходов других производств [4, 5].

Одним из наиболее перспективных субстратов для использования в биотехнологических процессах является глицерин. Так, во время получения 100 л биодизеля образуется (как продукт трансэтерификации растительных масел и животных жиров) до 10 л глицерина [8]. Невозможность использования в других технологиях такого огромного количества глицерина является сегодня наиболее важным фактором, который сдерживает производство биодизеля в мире.

Ранее из загрязненной нефтью почвы были изолированы нефтеокисляющие бактерии, идентифицированные как *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 [3]. Показано, что штамм ЕК-1 является активным продуцентом ПАВ. Установлены оптимальные для образования ПАВ условия культивирования *R. erythropolis* ЕК-1 на этаноле и гексадекане, позволяющие повысить в 3-5 раз показатели синтеза целевого продукта [1, 2].

Цель настоящей работы – исследовать синтез ПАВ *R. erythropolis* ЕК-1 при использовании в качестве ростовых субстратов промышленных отходов. Второй целью является определение эффективности использования поверхностно-активных препаратов *R. erythropolis* ЕК-1 в процессах очистки воды и почвы от нефти, исследование роли нативной микрофлоры воды и нефтеокислительных бактерий *R. erythropolis* ЕК-1 в процессах утилизации нефти.

Культивирование *R. erythropolis* ЕК-1 осуществляли на минеральной питательной среде следующего состава (г/л):  $\text{NaNO}_3$  – 1,3;  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,1;  $\text{NaCl}$  – 0,1;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  – 0,6;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0,14;  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,001; рН 6,8–7,0. В качестве источника углерода использовали гексадекан (2 %), глицерин (0,5–2 %), отходы производства масла (0,5 %), отработанное (пережаренное) масло (0,5 %), мелассу (0,5 % по углеводам), жидкие парафины (1 %). Культивирование бактерий осуществляли в колбах объемом 750 мл со 100 мл среды на качалке (320 об/мин) при 30 °С в течение 168 ч. В качестве препаратов ПАВ использовали постферментационную культуральную жидкость и супернатант культуральной жидкости. Для получения супернатанта культуральную жидкость центрифугировали в течение 30 мин (5000 g).

Препараты ПАВ в концентрации 5-30 мл распыляли на поверхности модельного водоема (емкость с 2 л бюветной воды, загрязненной 2,6 г/л нефти) и вносили в загрязненную нефтью почву в концентрации 100 – 300 мл (1 кг почвы с нативной микрофлорой загрязняли 20 мл нефти).

Содержание нефти в исследуемых образцах определяли весовым методом. Для этого осуществляли трехкратную экстракцию нефти гексаном (соотношение 1:1). Органический экстракт упаривали до по-

стоянної маси на роторному іспарителі ІР-1М2 (Росія) при температурі 55 °С і абсолютному тиску 0,4 атм.

Учитывая химический состав ПАВ, синтезированных *R. erythropolis* ЕК-1 (комплекс глико-, фосфо- и нейтральных липидов), а также возможность повышения эффективности синтеза микробных метаболитов в присутствии экзогенных предшественников (жирных кислот), мы предположили, что потенциальным дешевым субстратом для выращивания штамма ЕК-1 могут служить отходы производства растительных масел. В табл. 1 приведены данные о синтезе ПАВ на среде, содержащей пережаренное масло, а также с мелассу, глицерин.

Таблица 1 – Образование поверхностно-активных веществ в процессе культивирования *R. erythropolis* ЕК-1 на отходах

Субстрат	Показатели синтеза ПАВ	
	ПАВ*	E <sub>24</sub> , %
Отходы жировых производств	5,2±0,26	75±3,7
Отработанное (пережаренное) масло, 0,5 %	4,8±0,24	65±3,2
Меласса, 0,5 % (по углеводам)	3,3±0,16	40±2,0
Глицерин (0,5%)	3,3±0,16	50±2,5
Гексадекан, 2,0 % (контроль)	4,8±0,24	70±3,5
Жидкие парафины, 1,0 % (контроль)	5,9±0,29	80±4,0

Эксперименты показали, что после внесения препаратов поверхностно-активных веществ активная деструкция нефти наблюдалась уже на седьмые сутки. При этом нефтяная пленка теряла маслянистость, превращалась в скопления небольших сухих хлопьев, часть которых пребывала на поверхности воды, а часть после перемешивания оседала на дно модельных водоемов. Данные количественного определения остаточной нефти на 30 сутки эксперимента представлены в табл.2.

Приведенные данные показывают перспективность использования ПАВ *R. erythropolis* ЕК-1 для очистки воды от высоких концентраций нефти. Существенным преимуществом такого препарата является возможность его использования в виде постферментационной культуральной жидкости, а также высокая эффективность очистки от нефти при низкой концентрации ПАВ.

В табл. 3 приведены данные очистки почвы от нефти препаратами исследуемых ПАВ. Показано, что на 30 сутки степень деградации нефти достигала 86,4 % в присутствии ПАВ в виде культуральной жидкости (300 мл/кг почвы). Дальнейшие эксперименты показали, что микробная деструкция нефти обусловлена как непосредственным участием в этом процессе живых клеток нефтеокисляющих бактерий и их метаболитов, так и активацией природной нефтеокисляющей микрофлоры почвы под влиянием ПАВ.

Таблица 2 – Показатели очистки воды от нефти препаратами поверхностно-активных веществ *R. erythropolis* ЕК-1

Препараты ПАВ	Концентрация препарата ПАВ, %	Количество процедур обработки	Концентрация остаточной нефти, г/л	Степень деструкции нефти, %
Культуральная жидкость	5	Одна	0,20±0,01	92,3±2,6
	10	Две	0,32±0,015	87,7±2,3
	15	Одна	0,36±0,018	88,2±2,3
	30	Две	0,28±0,014	89,2±2,4
Супернатант	5	Одна	0,44±0,022	83,1±2,1
	10	Две	0,32±0,015	85,7±2,3
	15	Одна	0,38±0,019	85,4±2,2
	30	Две	0,32±0,015	87,7±2,2
Без обработки (контроль)			2,6±0,003	0

Таблица 3 – Влияние препаратов ПАВ *A. calcoaceticus* К-4 и *R. erythropolis* ЕК-1 на эффективность очистки почвы от нефти

Препараты ПАВ	Концентрация препарата ПАВ, мл/кг почвы	Концентрация остаточной нефти в пробе, г	Степень деструкции нефти, %
Культуральная жидкость	100	7,0±0,012	67,3±2,3
	200	5,7±0,023	73,4±2,7
	300	2,9±0,019	86,4±2,0
Супернатант	100	11,6±0,026	45,8±2,1
	200	10,4±0,015	51,4±2,2
	300	9,3±0,021	56,5±2,7
Контроль	0	21,4±0,015	0

#### Выводы

В результате проведенных исследований была показана возможность использования глицерина – побочного продукта производства биодизеля, а также отходов пищевых производств (жировой, сахарной промышленности) в качестве субстратов для получения микробных ПАВ.

В процессе работы установлено, что ПАВ *R. erythropolis* ЕК-1 интенсифицируют процессы деструкции нефти в воде и почве. Показана возможность использования для эффективной очистки воды (деградация на 83 – 92 % нефти в концентрации 2,6 г/л) невысоких концентраций препаратов ПАВ в виде культуральной жидкости (5 %).

Установлено, что ПАВ *R. erythropolis* ЕК-1 интенсифицируют процессы деструкции нефти в почве. На 30 сутки степень деградации нефти (21,4 г/кг почвы) в присутствии ПАВ (100 – 300 мл/кг почвы) в виде постферментационной культуральной жидкости составляла 51 – 86 %.

#### Литература

1. Игнатенко С.В., Пирог Т.П. Влияние внешних факторов на образование поверхностно-активных веществ при периодическом культивировании *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1 // Сб. трудов Межд. научн. конф. «Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии» (Минск, 3-6 июня 2008). – С. 164–166.
2. Пирог Т.П., Антонюк С.И., Карпенко Е.В., Шевчук Т.А. Влияние условий культивирования штамма *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 на синтез поверхностно-активных веществ // Прикладная биохимия и микробиология. – 2009. – Т.45, № 3. – С. 304–310.
3. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Волошина И.Н., Гречирчак Н.Н. Использование иммобилизованных на керамзите клеток нефтеокисляющих микроорганизмов для очистки воды от нефти // Прикладная биохимия и микробиология. – 2005. – Т. 41, № 1. – С. 58–63.
4. Dessai J.D., Banat I.M.. Microbial production of surfactants ant their commercial potential // Microbiol. Mol. Rev. – 1997. – N 61. – P. 47-64.
5. Pekin G., Vardar-Sukan F., Kosaric N. Production of soforolipids from *Candida bombicola* ATCC 22214 using Turkish corn oil and honey // Eng. Life Sci. – 2005. – N 4. – P. 357-362
6. Ron E.Z., Rosenberg E. Biosurfactants and oil bioremediation // Curr. Opin. Biotechnol. – 2002. – Vol. 13, № 3. – P. 249–252
7. Singh A., Van Hamme J.D., Ward O.P. Surfactants in microbiology and biotechnology. Part 2. Applications aspects // Biotechnol. Adv. – 2007. – Vol. 25. – P. 99–121
8. Yazdani S.S., Gonzales R. Anaerobic fermentation og glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry // Curr. Opin. Biotechnol. – 2007. – Vol. 18. – P. 213–219