

А. К. СТРЕЛКОВ
А. О. БАЗАРОВА
С. Ю. ТЕПЛЫХ

МЕТОДИКА ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ БИОПРЕПАРАТА НА СТОЧНЫХ ВОДАХ МАСЛОЭКСТРАКЦИОННОГО ПРОИЗВОДСТВА

METHOD FOR ASSESSING THE EFFICIENCY
OF THE USE OF A BIOLOGICAL PREPARATION IN WASTEWATER
OF OIL EXTRACTION PRODUCTION

Одним из перспективных способов удаления жиров в сточных водах пищевых предприятий является биоферментная технология разложения органических веществ, в том числе жиров и растительных масел на локальных очистных сооружениях, находящихся непосредственно на предприятиях. Биоферментные технологии по разложению и утилизации жиров в сточных водах основаны на использовании микробных липаз и микроорганизмов, способных к их продуцированию. Эксперимент был проведен на территории маслоэкстракционного завода г. Безенчук Самарской области в течение 18 дней. На основании отобранных проб была выявлена концентрация триглицеридов, определена деструктивная способность, а также липолитическая активность после введения биопрепарата.

Ключевые слова: масложировые сточные воды, биопрепарат, биологический метод очистки, липаза

Поиск, выделение и изучение возможности использования микроорганизмов для очистки жиросодержащих сточных вод начали наиболее активно проводить в 1970-1980-е гг. Активные исследования в этом направлении велись как в странах бывшего Советского Союза, так и за рубежом [1–5]. Наиболее глубоким исследованием в этот период были подвергнуты бактерии

One of the promising ways to remove fats in the wastewater of food enterprises is the bioenzymatic technology for the decomposition of organic substances, including fats and vegetable oils, at local treatment facilities located directly at the enterprises. Bioenzymatic technologies for the decomposition and utilization of fats in wastewater are based on the use of microbial lipases and microorganisms capable of producing them. The experiment was carried out on the territory of the oil extraction plant in Bezenchuk for 18 days. Based on the samples taken, the concentration of triglycerides was revealed, the destructive ability was determined, as well as lipolytic activity after the introduction of the biological product.

Keywords: oil and fat wastewater, biological product, biological treatment method, lipase

рода *Bacillus*, *Pseudomonas* и дрожжи *Yarrowia*. В 1990 г. расширение поиска микроорганизмов для очистки сточных вод способствовало вовлечению исследователями в список липолитических активных культур микроорганизмов родов *Chromobacter*, *Micrococcus*, *Acinetobacter*, *Rhodococcus* [4,6,7]. Существенный интерес к изучению липолитической активности микро-

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-35-90026.
Acknowledgments: The reported study was funded by RFBR, project number № 20-35-90026

организмов *Serratia marcescens* объясняет пристальное внимание исследователей к данным штаммам благодаря их способности синтезировать продигиозин [8]. С 2000-х гг. и по настоящее время данная культура изучается преимущественно в качестве продуцента липазы [9,10].

К числу основополагающих технологических характеристик микроорганизмов, используемых для очистки жиросодержащих сточных вод, относится их деструктивная активность, направленная на разрушение липидов до углекислого газа и воды. Наиболее важную роль в процессе распада органических веществ играют ферменты-биокатализаторы, образующиеся в клетке и представляющие собой либо простые белки, либо сложные, содержащие не аминокислотные компоненты [11,12]. В частности распад нейтральных липидов происходит за счет гидролитического действия липаз. Результатом является образование глицерина и жирных кислот.

Анализ литературных источников показывает, что изучение деструкции ведется как в отношении растительных масел (подсолнечное, оливковое, пальмовое, рапсовое), так и жиров животного происхождения (говяжий, свиной, бараний).

Липазы являются ферментами, синтез которых зависит от скорости роста и развития продуцента, его биосинтетической способности. Как показали многолетние исследования, для каждого штамма свойственны свои оптимальные условия культивирования, включающие компоненты питательной среды (источники углерода, азота, присутствие липидов, неорганические соли) и физико-химические факторы процесса ферментации (температура, pH среды, режим перемешивания и аэрации) [13,14].

Возможность применения липолитически активных культур, обладающих деструктивной способностью и субстратной специфичностью к жирам в сточных водах пищевых производств, отображена в работах [15–17]. При подборе наиболее активных штаммов и поддержании определенных условий очистки эффект мог бы достигать 80–90 %.

Предмет исследования

Исследования проводились на территории маслоэкстракционного завода в г. Безенчук Самарской области в течение 18 дней.

Эксперимент по определению деструктивной активности микроорганизмов на сточных водах с высоким содержанием жиров, нефтепродуктов и фенольных примесей был осуществлен с помощью биопрепарата «Русский богатырь № 4». Источником триглицеридов служили отобранные пробы сточных вод маслоэкстракционного завода, поступающие на модельную

установку, и очищенные сточные воды. Доза введенного препарата составила 6,25 мг/л. Время пребывания в аэрационном сооружении составляло 50–60 мин, отбор контрольных проб производился каждый день работы установки.

Объектом исследования служили пробы сточных вод маслоэкстракционного завода, объем каждого образца составлял 1,5 л, из которого бралась аликвота для определения исследуемых показателей в соответствии с методикой эксперимента. Все исследования выполнены в двух повторах на один образец.

Материалы и методы

Определение содержания триглицеридов в сточных водах проводили в лабораторных условиях с применением методики по определению нейтральных жиров.

Принцип метода заключается в том, что триглицериды экстрагируются смесью гептана и изопропилового спирта, в которую переходят только неполярные липиды. Триглицериды гидролизуются щелочью, глицерин окисляется йодной кислотой до формальдегида, который определяется по цветной реакции с ацетилацетоном.

Далее требуется внести во флакон с завинчивающейся тefлоновой крышкой навеску сухой измельченной ткани, доведенной до постоянной массы (25–30 мг). Добавить 3,5 мл изопропилового спирта и 2 мл гептана. Интенсивно встряхнуть и поставить в термостат при температуре 37 °С на ночь. На следующий день добавить в каждый флакон 0,5 мл воды и 1,0 мл 0,16 М раствора серной кислоты. Закрывать флакон крышкой, интенсивно встряхнуть, смесь перелить в центрифужную пробирку и центрифугировать 15 мин при 1500 об/мин. Из верхнего (гептанового) слоя отобрать 0,4 мл и перенести в стеклянную мерную пробирку со шлифом и притертой пробкой. Добавить 2,0 мл изопропилового спирта и 40 мкл 6,25 М раствора КОН. Перемешать, закрыть пробкой и нагреть на водяной бане 10 мин при температуре 70 °С. После охлаждения добавить 0,2 мл раствора йодной кислоты и 1 мл ацетилацетонового реактива. После перемешивания снова закрыть пробкой и нагревать еще 10 мин при 70 °С. Развивается желто-зеленое окрашивание, интенсивность которого измеряют, фотометрируя образцы при длине волны 425 нм в кюветках с длиной оптического пути 0,5 см против контрольной пробы, которую ставят так же, как и опытную, но без навески исследуемого материала.

Определение содержания триглицеридов проводили с использованием калибровочного графика, построенного по стандартному раствору. 20,4 мг топленого животного жира растворяли в 1 мл изопропилового спирта.

Проба № 1. В стеклянную мерную пробирку со шлифом внести 200 мкл калибровочного раствора, добавить 3,3 мл изопропилового спирта (4,08 мг жира).

Проба № 2. К 100 мкл калибровочного раствора добавить 3,4 мл спирта (2,04 мг жира).

Проба № 3. К 50 мкл калибровочного раствора добавить 3,45 мл изопропилового спирта (1,02 мг жира).

Проба № 4. Отобрать 25 мкл калибровочного раствора и внести 3,48 мл спирта (0,51 мг триглицеридов).

Проба № 5. Включает 12,5 мкл калибровочного раствора и 3,50 мл изопропилового спирта (0,255 мг).

Калибровочные пробы обрабатываются так же, как и экспериментальные. Расчёт результата проводился по калибровочной кривой.

Определение содержания триглицеридов проводили с использованием калибровочного графика, построенного по стандартному раствору. 20,4 мг топленого животного жира растворяли в 1 мл изопропилового спирта.

Расчет триглицеридов производился по формуле

$$C_{\text{оп}} = (0,816 \cdot \frac{E_{\text{оп}} - E_{\text{к}}}{2,10}) \cdot 5 \cdot 20, \quad (1)$$

где $C_{\text{оп}}$ – концентрация триглицеридов в исследуемом образце, мг/л;

0,816 мг – одержание триглицеридов в пробе стандарта (0,4 мл из 2 мл гептана, стандартный р-р 4,08 мг);

$E_{\text{оп}}$ – оптическая плотность опытной пробы;

$E_{\text{к}}$ – средняя оптическая плотность контроля, 0,126 ед;

2,10 – средняя оптическая плотность стандарта (0,816 мг/пробу) с вычетом оптической плотности контроля;

5 – коэффициент пересчета (так как по методике в пробу берется 0,4 мл из 2 мл гептана);

20 – коэффициент пересчета на 1 л (так как выпаривается 50 мл).

Для определения активности фермента использовали набор «ЛИПАЗА» (LPS) («Ди-аВетТест», Россия) для полуавтоматических анализаторов, адаптировав для определения в пробах сточных вод.

Расчет активности липазы производили по формуле

$$A = 154 \cdot \frac{\Delta E_{\text{оп}} - \Delta E_{\text{к}}}{\Delta E_{\text{ст}} - \Delta E_{\text{к}}}, \quad (2)$$

где A – активность липазы, Е/л;

154 – активность липазы в стандартной сы-воротке, Е/л;

$(\Delta E_{\text{оп}} - \Delta E_{\text{к}})$ – разница оптической плотности опытной и контрольной проб;

$(\Delta E_{\text{ст}} - \Delta E_{\text{к}})$ – разница оптической плотности стандартной и контрольной проб.

Данные, полученные при применении дан-ного метода, позволят оценить интенсивность развития углеводородокисляющих микроор-ганизмов, а также биодеградации в отношении конкретных веществ, что позволит утверждать о возможности биохимической очистки сточ-ных вод биопрепаратом.

Результаты

Зависимость оптической плотности рас-творя от концентрации триглицеридов, пред-

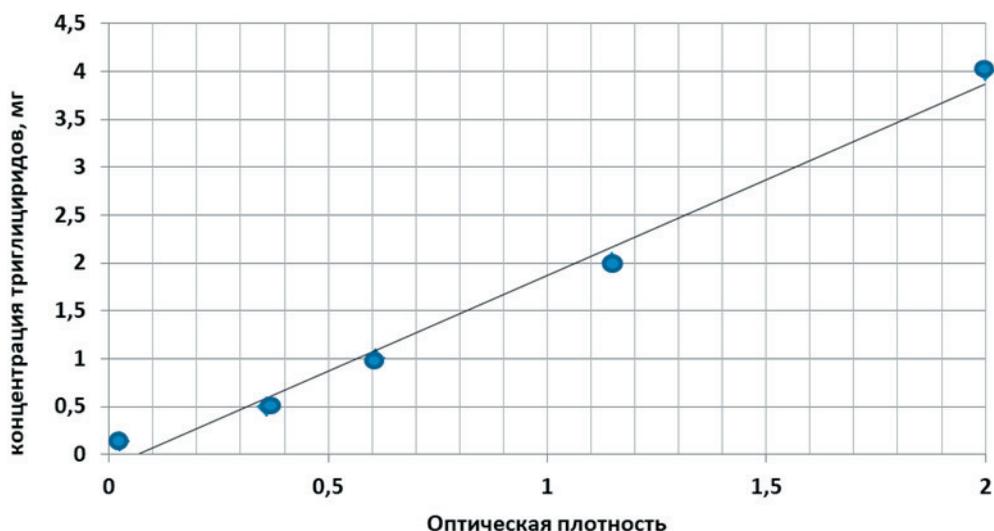


График зависимости оптической плотности раствора от содержания триглицеридов

ставленная на калибровочном графике, построенном по стандартам с концентрациями от 0,255 до 4,08 мг на пробу, носила прямолинейный характер (см. рисунок).

Из полученных результатов видно (см. таблицу), что содержание триглицеридов в образцах составило от 2,72 мг/л в пробе №8 до 95,55 мг/л в пробе №5. Пик деструктивной ак-

тивности приходился на 3–6-е сутки, через трое суток – 73,62 %, через 5 суток – 22, 66 %, на 7-е и 9-е сутки – концентрация загрязнений была незначительной, снижение на 81,16–96,96 %.

Липолитическая активность в образцах сточных вод составила от 0,00 до 77,00 Е/л, наиболее активный рост зафиксирован на 5-е сутки после введения разовой дозы биопрепарата 6,25 мг/л.

Концентрация триглицеридов и активность липазы в образцах сточных вод

№ пробы	Концентрация триглицеридов в исходной воде, мг/л	Активность липазы в исходной воде Е/л	№ пробы	Концентрация триглицеридов после введения биопрепарата, мг/л	Активность липазы после введения биопрепарата Е/л
1	90,54	0,00	2	90,15	0,00
1'	91,16	0,00	2'	90,54	0,00
3	42,74	4,53	4	12,51	9,06
3'	43,29	13,59	4'	11,42	13,59
5	95,55	0,00	6	68,16	0,00
5'	94,62	0,00	6'	66,33	4,53
7	89,48	2,43	8	2,72	69,06
7'	90,55	7,34	8'	2,80	77,00
9	10,69	4,53	10	1,94	9,06
9'	11,15	13,59	10'	2,10	13,59

Выводы. 1. Перспективным направлением является разработка технологии биологической очистки жиродержащих сточных вод с помощью микроорганизмов, обладающих липолитической активностью и способных утилизировать жировые вещества различной природы.

2. Под действием микроорганизмов биопрепарата, в исследуемых пробах сточных вод была определена динамика изменения концентрации триглицеридов от 2,72 до 95,55 мг/л, липолитическая активность – от 0,00 до 77,00 Е/л, что свидетельствует о биодеградации загрязняющих веществ в сточных водах маслоэкстракционного завода г. Безенчук Самарской области.

3. Полученные результаты могут служить дополнительным инструментом для внедрения новых методов контроля сточных вод предприятий пищевой промышленности.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- Ласков Ю.М. Изыскания и исследования экологических и эффективных методов и сооружений для очистки сточных вод предприятий легкой промышленности: автореф. дис. ... д-ра техн. наук: 05.23.04 / Моск. инженер.-строит. ин-т. М., 1974. 25 с.
- Baig N. The use of bacteria to reduce clogging of sewer lines by grease in municipal sewage /

N Baig. E Grenning // Biological Control of water Pollution: University of Pennsylvania Press/ J Tourbier, R. W. Pierson (eds.). 1976. P. 245–253.

3. Cavagnaro P.V. Pretreatment limits for fats, oil and grease in domestic wastewater/ P.V. Cavagnaro, K. E. Kaszubowski, H. Needles//Proc. 43 Industrial Waste Conference Purdue University/ West Lafayette, 1988. P. 777–789.

4. Kokusho H, Study on alkaline lipase isolation and identification of lipase producing microorganism / H Kkusho, H Machida, S Iwasaki // Arg. Bio. Chem. 1982. P. 1159–1164.

5. Suwansunthichai K. Selection of lipase producing bacteria from soil and optimization of enzyme production/ K Suwansunthichai // MS Thesis. Bangkok, 1989. P. 265–274.

6. Биотехнологический способ очистки сточных вод от масел и жиров: пат. RU 2161595 Российской Федерации: МПК С2 С 02А 3/34, С 12Т 1/20 / Б.Г. Мурзаков, А.И. Заикина, В.П. Зобнина, Е.Л. Листов, Л.В. Зорнина, Р. А. Рогачева; дата опубл. 30.04.2001.

7. Biodegradation of palmarosa oil (green oil) by *Serratia marcescens* / S. Mohanan [et al.] // Int. J. Environ. Sci. Tech. 2007. Vol. 4, №2. P. 227–181.

8. Ксенофонтов Б.С. Флотационная обработка воды, отходов и почвы. М.: Новые технологии, 2010.

9. Проскорякова Н.В. Разработка основы биопрепарата для деструкции жиров: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.23 / Ин-т биологии Уфим. науч. Центра РАН. Уфа, 2007. 24 с.

10. Jameel A.T. Aerobic biodegradation of oil and grease in palm oil mill effluent using consortium of microorganisms / A.T. Jameel, A.A. Olanrewaju//Islamic University Malaysia (IUM). Kuala Lumpur, 2011. Vol. III. P. 43–51.

11. Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф. Биологическая химия. М.: Медицина, 1998. 704 с.

12. Ksenofontov B. Analysis of hydraulic modes of operation of the divergent plates block of the flotation-sedimentation tank / B. Ksenofontov, E. Senik, M. Ivanov // IOP Conference Series: Materials Science and Engineering. IOP Publishing, 2019. Vol. 492. № 1.

13. Jaeger K.E. Lipases for biotechnology / K. E. Jaeger, T. Eggert // Curr. Opin. Biotechnol. 2002. Vol. 13. P. 390–397.

14. Macrae A.R. Lipase catalyzed interesterification of oil and fat/ A.R. Macrae // J Amer. Oil. Chem. 1983. Vol. 60, №2. P. 243A–246A.

15. Очистка сточных вод предприятий пищевой промышленности от поверхностно активных веществ и жиров флотационными способами / Б.С. Ксенофонтов, А.С. Козлов, Р.А., Тараканов, А.А. Балина, М.С. Виноградов, Д.В. Сазонов // Экология и промышленность. 2013. № 11. С. 4–7.

16. Hong M.C./ Purification and characterization of an alkaline lipase from a newly isolated *Acinetobacter redioresistens* СМС-1 / M.C. Hong, M.C. Chang // Biotechnol. Lett. 1998. Vol. 20. P. 1027–1029 9.

17. Stoll U. Management strategies for oil and grease residues / U Stoll, H Gupta // Was. Manage. Res. 1997. Vol. 15. P. 23–32.

REFERENCES

1. Laskov Yu.M. *Izyskaniya i issledovaniya jekologicheskikh i jeffektivnyh metodov i sooruzhenij dlja ochildki stochnyh vod predpriyatij legkoj promyshlennosti*. Avtoref. Doct. Diss. [Surveys and studies of ecological and effective methods and facilities for wastewater treatment of light industry enterprises. Doct. Diss. Ext. Abst.]. Moscow, 1974. 25 p.

2. Baig N., Grenning E. The use of bacteria to reduce clogging of sewer lines by grease in municipal sewage. Biological Control of water Pollution: University of Pennsylvania Press. J Tourbier, R. W. Pierson (eds.), 1976, pp 245-253.

3. Cavagnaro P.V., Kaszubowski K.E., Needles H. Pretreatment limits for fats, oil and grease in domestic wastewater. Proceedings of 43 Industrial Waste Conference: Purdue University, West Lafayette, 1988, pp. 777-789.

4. Kokusho H, Machida H., Iwasaki S. Study on alkaline lipase isolation and identification of lipase producing microorganism. Arg. Bio. Chem., 1982, pp. 1159-1164.

5. Suwansunthichai K. Selection of lipase producing bacteria from soil and optimization of enzyme production. MS Thesis. Bangkok, 1989, pp. 265-274.

6. Murzakov B.G., Zaikina A.I., Zobnina V.P., Listov E.L., Zornina L.V., Rogacheva R.A. *Biotehnologicheskij sposob ochildki stochnyh vod ot masel i zhirov* [Biotechnological method of wastewater treatment from oils and fats.]. Patent RF, no. RU 2161595, 2001.

7. Mohanan S. Biodegradation of palmarosa oil (green oil). International Journal of Environmental Science Technologies, 2007, vol. 4, no. 2, pp. 227-181.

8. Ksenofontov B.S. *Flotacionnaja obrabotka vody, othodov i pochvy*. [Flotation treatment of water, waste and soil]. Moscow, 2010.

9. Proskoryakova N.V. *Razrabotka osnovy biopreparata dlja destrukcii zhirov*. Avtoref. Cand. Diss. [Development of the basis of a biological product for the destruction of fats. Cand. Diss. Ext. Abst.]. Ufa, 2007. 24 p.

10. Jameel A.T., Olanrewaju A.A. Aerobic biodegradation of oil and grease in palm oil mill effluent using consortium of microorganisms Islamic University Malaysia (IUM). Kuala Lumpur, 2011, vol. III, pp. 43-51.

11. Berezov T.T., Korovkin B.F. *Biologicheskaja himija* [Biological Chemistry]. Moscow, Medicine Publ., 1998. 704 p.

12. Ksenofontov B., Senik E., Ivanov M. Analysis of hydraulic modes of operation of the divergent plates block of the flotation-sedimentation tank. IOP Conference Series: Materials Science and Engineering, 2019, vol. 492, article number 012024. DOI: 10.1088/1757-899X/492/1/012024

13. Jaeger K.E., Eggert T. Lipases for biotechnology. Current Opinion in Biotechnology, 2002, vol. 13, pp. 390-397.

14. Macrae A.R. Lipase catalyzed interesterification of oil and fat. Journal of American Oil Chemistry, 1983, vol. 60, no. 2, pp. 243A-246A.

15. Ksenofontov B.S., Kozlov A.S., Tarakano R.A.v, Balina A.A., Vinogradov M.S., Sazonov D.V. Wastewater treatment of food industry enterprises from surfactants and fats by flotation methods. *Jekologija i promyshlennost'* [Ecology and Industry], 2013, no. 11, pp. 4-7. (in Russian)

16. Hong M.C., Chang M.C. Purification and characterization of an alkaline lipase from a newly isolated *Acinetobacter redioresistens*. Biotechnological Letters, 1998, vol.20, pp 1027-1029.

17. Stoll U., Gupta H. Management strategies for oil and grease residues. Was. Manage. Res., 1997, vol. 15, pp. 23-32.

Об авторах:

СТРЕЛКОВ Александр Кузьмич

доктор технических наук, профессор, заведующий
кафедрой водоснабжения и водоотведения
Самарский государственный технический университет
Академия строительства и архитектуры
443100, Россия, г. Самара, ул. Молодогвардейская, 244
E-mail: a19400209@yandex.ru

БАЗАРОВА Анастасия Олеговна

аспирант кафедры водоснабжения и водоотведения
Самарский государственный технический университет
Академия строительства и архитектуры
443100, Россия, г. Самара, ул. Молодогвардейская, 244
E-mail: bystranova14@mail.ru

ТЕПЛЫХ Светлана Юрьевна

кандидат технических наук, доцент, доцент кафедры
водоснабжения и водоотведения
Самарский государственный технический университет
Академия строительства и архитектуры
443100, Россия, г. Самара, ул. Молодогвардейская, 244
E-mail: kafvv@mail.ru

STRELKOV Alexander K.

Doctor of Engineering Science, Head of the Water Supply
and Wastewater Chair
Samara State Technical University
Academy of Civil Engineering and Architecture
443001, Russia, Samara, Molodogvardeyskaya str., 244
E-mail: a19400209@yandex.ru

BAZAROVA Anastasya O.

Postgraduate Student of the Water Supply and
Wastewater Chair
Samara State Technical University
Academy of Civil Engineering and Architecture
443001, Russia, Samara, Molodogvardeyskaya str., 244
E-mail: bystranova14@mail.ru

TEPLYKH Svetlana Yu.

PhD in Engineering Science, Associate Professor the Water
Supply and Wastewater Chair
Samara State Technical University
Academy of Civil Engineering and Architecture
443001, Russia, Samara, Molodogvardeyskaya str., 244
E-mail: kafvv@mail.ru

Для цитирования: Стрелков А.К., Базарова А.О., Теплых С.Ю. Методика оценки эффективности применения биопрепарата на сточных водах маслоэкстракционного производства // Градостроительство и архитектура. 2022. Т. 12, № 3. С. 28–33. DOI: 10.17673/Vestnik.2022.03.4.

For citation: Strelkov A.K., Bazarova A.O., Teplykh S. Yu. Method for Assessing the Efficiency of the Use of a Biological Preparation in Wastewater of Oil Extraction Production. *Gradostroitel'stvo i arhitektura* [Urban Construction and Architecture], 2022, vol. 12, no. 3, pp. 28–33. (in Russian) DOI: 10.17673/Vestnik.2022.03.4.