

АЛЬТЕРНАТИВНА ПЕРЕРОБКА ПРОМИСЛОВИХ ВІДХОДІВ У ПРАКТИЧНО ЦІННІ ПРОДУКТИ МІКРОБНОГО СИНТЕЗУ ДЛЯ ПРИРОДООХОРОННИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Ще відносно недавно ні в кого не виникало сумніву у тому, що навколишнє середовище – повітря, земля і вода – завжди будуть ефективно «переробляти» побутові, промислові і сільськогосподарські відходи. Тепер ми знаємо, що це не так. Людство зіштовхнулось з двома фундаментальними проблемами: переробка відходів, постійно утворюваних у величезній кількості, та деструкція токсичних сполук, що десятиліттями накопичувалися на звалищах, у воді та ґрунті. Слід зазначити, що небезпечними є не лише відходи, що містять токсичні речовини (наприклад, фенол та його похідні), а й відходи, які потрапляють у навколишнє середовище у неконтрольованій кількості, наприклад, олієвімісні (відходи оліє-жирового виробництва, пересмажена олія після використання у закладах громадського харчування тощо). Близько 38% відходів, до яких належать і пересмажені олії, утворюється в процесі обробки харчових продуктів.

Біопаливо, зокрема біодизель, належить до найперспективніших заміників викопного палива. Щорічне збільшення обсягів виробництва біодизелю становить 8–10 %, Проте у зв'язку з інтенсивним зростанням попиту на біодизель у світі виникає проблема утилізації побічного продукту – гліцерину. Гліциринова фракція містить велику кількість різних домішок, що робить неможливим її використання в багатьох традиційних сферах застосування гліцерину, а через підвищену лужність і вміст метанолу його зберігання та утилізація є серйозною екологічною проблемою. Прогресуючі темпи нафтового забруднення навколишнього середовища потребують розробки екологічно безпечних та економічно обґрунтованих способів очищення, спрямованих на інтенсифікацію процесів розкладання вуглеводнів. Таким методом очистки ґрунтів і води від нафти є біоремедіація, що базується на природному потенціалі мікроорганізмів. Відомо, що за присутності важких металів ефективність деструкції нафти може знижуватися, тому важливою задачею сьогодення є пошук методів очищення довкілля від таких комплексних забруднень.

Ароматичні сполуки вперше знайшли практичне використання у хімічній промисловості у 50-х роках ХХ ст. Враховуючи пластичність, адгезивність, виражені діелектричні властивості, стійкість до дії хімічних і фізичних факторів, вони одразу ж стали незамінними у нафтопереробній, коксохімічній, фармацевтичній, будівельній, деревообробній галузі та сільськогосподарському секторі. У результаті промислової діяльності людини збільшується надходження в навколишнє середовище моно(полі)ароматичних вуглеводнів і їх похідних, стійких до дії зовнішніх факторів, і яким притаманна токсичність і канцерогенні властивості, що становить суттєву небезпеку для здоров'я людини і біосфери в цілому. Починаючи з 70-х років ХХ ст., увагу дослідників усього світу привернула проблема пошуку ефективних методів очищення довкілля від сполук ароматичної природи. Спочатку технології знешкодження ароматичних сполук ґрунтувалися на використанні фізичних, хімічних та фізико-хімічних способів, заснованих на сорбції, екстракції, коагуляції, флотації, тепловій адсорбції та окисненні органічних сполук. На рубежі ХХ–ХХІ ст., з розвитком науково-технічного прогресу було показано, що біотехнології можуть стати альтернативою вище згаданим розробкам завдяки безпечності, дешевизні та високому потенціалу штамів-деструкторів сполук ароматичної природи. В останні десятиліття мікробні поверхнево-активні речовини (ПАР) є об'єктом інтенсивних теоретичних і прикладних досліджень, що зумовлене їх можливим практичним використанням у різних галузях промисловості, а також у природоохоронних технологіях для очищення довкілля.

У попередніх дослідженнях із забруднених нафтою зразків ґрунту виділено штами нафтоокиснювальних бактерій, ідентифіковані як *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1, *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 та *Nocardia vaccinii* К-8. Штами зареєстровано у Депозитарії мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України за номерами ІМВ Ас-5017, ІМВ В-7241 та ІМВ В-7405, відповідно.

Показано можливість використання відходів виробництва біодизелю як ростового субстрату для синтезу ПАР штамми ІМВ Ас-5017, ІМВ В-7241 і ІМВ В-7405. Встановлено можливість підвищення в 1,5–3 рази синтезу ПАР *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 і *N. vaccinii* ІМВ В-7405 за внесення у середовище з відходами виробництва біодизелю екзогенних попередників (органічні кислоти, соняшникова олія, глюкоза, 0,05–0,1 %), а також під час культивування *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 і *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на суміші відходів виробництва біодизелю і гексадекану у молярному співвідношенні 1:8. Показано, що збільшення концентрації інокуляту до 10–15 % і підвищення у два рази вмісту джерела азотного живлення дає змогу реалізувати процес синтезу ПАР досліджуваними штамми на середовищі, що містить 7–8 % (об'ємна частка) відходів виробництва біодизелю. Селекціоновані штами *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017, *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 і *N. vaccinii* К-8 характеризуються стійкістю до високих (до 5–7 %) концентрацій натрієвих і калієвих солей, їх алкогольдегідрогеназам притаманна широка субстратна специфічність, завдяки чому вони здатні до синтезу поверхнево-активних речовин за умов росту саме на відходах виробництва біодизелю (гліциринова фракція, що містить до 80 % гліцерину, калієві або натрієві солі, а також метанол чи етанол) без будь-якого попереднього очищення цього токсичного відходу. Встановлено можливість використання відпрацьованої соняшникової олії для біосинтезу ПАР штамми ІМВ В-7241, ІМВ Ас-5017, ІМВ В-7405. Показники синтезу ПАР за умов росту досліджуваних штамів на середовищі з відпрацьованою олією (2–5 %, об'ємна частка) були у 2–2,5 рази вищими, ніж на традиційних гідрофобних субстратах. Внесення у середовище 0,1 % глюкози супроводжувалося

інтенсифікацією у 2–4 рази синтезу ПАР *R. erythropolis* IMB Ac-5017 і *N. vaccinii* IMB B-7405 на відпрацьованій соняшникової олії (2 %). За таких умов культивування концентрація позаклітинних ПАР досягала 6,8 і 4,5 г/л для штамів IMB Ac-5017 і IMB B-7405 відповідно.

Встановлено здатність *R. erythropolis* IMB Ac-5017, *A. calcoaceticus* IMB B-7241 і *N. vaccinii* IMB B-7405 розкладати ароматичні сполуки (фенол, нафталін, толуол, гексахлорбензол, бензойна та N-фенілантранілова кислота) з одночасним синтезом позаклітинних метаболітів з поверхнево-активними та емульгуювальними властивостями.

Дотепер для очищення води і ґрунту від нафти переважно використовуються біопрепарати, що являють собою ліофілізовану біомасу (або пасту) нафтоокиснювальних бактерій. Проте мікроорганізми, інтродуковані в забруднені нафтою екосистеми, потребують певного часу на адаптацію до нових умов існування. У зв'язку з цим більш ефективним (порівняно з біоаугментацією) є інший спосіб очищення – біостимуляція, що передбачає використання різних речовин, у тому числі й поживних, стимулюючих автохтонну (природну) мікробіоту. Ефективними стимуляторами природної нафтоокиснювальної мікробіоти є мікробні ПАР, причому найефективніше видалення вуглеводнів досягається за використання мікроорганізмів, здатних асимілювати нафту з одночасним синтезом ПАР. У зв'язку з цим як основні препарати для нафтоочищення ми використовували культуральну рідину, що містить як клітини нафтоокиснювальних бактерій, так і утворені ними ПАР.

Встановлено, що ПАР *A. calcoaceticus* IMB B-7241, *R. erythropolis* IMB Ac-5017 і *N. vaccinii* IMB B-7405 інтенсифікують процеси деструкції нафти в воді і ґрунті у результаті стимуляції природної нафтоокиснювальної мікрофлори. Ступінь деструкції нафти у воді (2,6–3 г/л) за наявності 5% культуральної рідини на 20–30 добу досягав 81–95 %. Через 30 діб ступінь розкладання нафти у ґрунті (21,4 г/кг) за наявності препаратів ПАР (100–300 мл/кг) у вигляді постферментаційної культуральної рідини становив 80–88 %.

Ефективність очищення забрудненої нафтою (100–200 мг/л) води іммобілізованими на керамзиті клітинами *R. erythropolis* IMB Ac-5017 за високої швидкості потоку (до 0,68 л/год), низької аерації (до 0,1 л/л за хв) і періодичної подачі 0,01% діамонійфосфату становила 99,5–99,8 %.

Показано високу ефективність застосування невисоких (5 %) концентрацій препаратів ПАР *A. calcoaceticus* IMB B-7241, *R. erythropolis* IMB Ac-5017 і *N. vaccinii* IMB B-7405 у вигляді культуральної рідини для очищення комплексних з важкими металами нафтових забруднень. Встановлено стимулювальний вплив Cu^{2+} (0,01–1,0 мМ) на розкладання нафти і комплексних з важкими металами (Cd^{2+} , Pb^{2+} , 0,01–0,1 мМ) нафтових забруднень у ґрунті та воді, оброблених ПАР досліджуваних штамів. Показано, що після обробки культуральної рідиною штамів *A. calcoaceticus* IMB B-7241, *R. erythropolis* IMB Ac-5017 і *N. vaccinii* IMB B-7405 ступінь деструкції нафти у воді (3,0–6,0 г/л) і ґрунті (20,0 г/кг) за присутності 0,01–1,0 мМ Cu^{2+} або Cu^{2+} і Cd^{2+} чи Pb^{2+} через 20–30 діб становив 85–98 %, у той час як без катіонів міді – 70–76 %. Ми припускаємо, що одним з механізмів, які зумовлюють підвищення деструкції нафти за присутності невисоких концентрацій катіонів міді, може бути стимуляція Cu^{2+} активності алкангидроксилаз (перших ферментів катаболізму вуглеводнів) як штамів-продуцентів ПАР, так і природної нафтоокиснювальної мікробіоти.

Отже, розроблено нові ланцюгові природоохоронні біотехнології, які охоплюють такі складові: утилізація відходів → отримання цінного цільового продукту → використання продукту для очищення довкілля від ксенобіотиків. Реалізація таких біотехнологій дає змогу вирішити відразу кілька актуальних проблем. **По-перше**, підвищення рентабельності та ефективності виробництва біодизелю в результаті використання побічного продукту гліцерину як субстрату у біотехнологічних процесах. **По-друге**, зниження собівартості виробництва препаратів ПАР, які синтезуються з промислових відходів, отже витрати на сировину зводяться практично до нуля. **По-третє**, очищення довкілля від ксенобіотиків. Використання у природоохоронних технологіях препаратів ПАР у вигляді нативної культуральної рідини дає змогу додатково знизити витрати на їх виробництво через відсутність стадій виділення та очищення цільового продукту. Крім того, препарати ПАР є екологічно безпечними, оскільки після застосування для очищення екосистем вони піддаються повній біологічній деструкції (до вуглекислого газу та води), а отже, не створюють додаткового екологічного навантаження.