**АННОТАЦИЯ**

ИЗУЧЕНИЕ СПОСОБНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ ДЕСТРУКТИРОВАТЬ ЖИРОВЫЕ ВЕЩЕСТВА РАЗЛИЧНОЙ ХИМИЧЕСКОЙ ПРИРОДЫ

Выпускная квалификационная работа (дипломная работа). ФСТД, 2005. 96 с., 14 рис., 13 табл., 84 источников, 2 прил.

Объектом исследования являются микроорганизмы, выделенные из различных природных жиров: нерпичьего, шерстного и микроорганизмы, выделенные из сточных вод после проведения процесса обезжиривания.

Цель работы — изучение морфолого-культуральных и физиологических свойств аборигенных микроорганизмов, и исследование их деструктивной активности.

В результате исследования выделены колонии микроорганизмов, определены их свойства, изучена их деструктивная способность. Показана возможность применения микроорганизмов, обладающих липолитической активностью для биотехнологического процесса обезжиривания меховой овчины, шкурок енота и белки.

Установлено, что предложенный экобиотехнологический способ обезжиривания обеспечивает оптимальное удаление жировых веществ с поверхности волосяного покрова и из кожевой ткани.

Разработаны маточные растворы для обезжиривания, позволяющие проводить процесс обезжиривания с меньшим расходом синтетических поверхностно-активных веществ, и исключением из рабочего состава формальдегида и карбоната натрия.

Основные технологические показатели: исключение из сточных вод формальдегида, синтетических поверхностно-активных веществ, сокращение расхода химматериалов.

Область применения – для дальнейшего внедрения в производство.

Экономический эффект достигается за счет сокращения расхода химматериалов и снижения степени загрязнения отработанных растворов.

**Оглавление**

Введение

1 Литературный обзор. Жировые вещества и современные способы

их удаления и утилизации

1.1 Структура жировых веществ

1.2 Современные методы обезжиривания

1.3 Очистка сточных вод от жиров

2 Объекты и методы исследования

2.1 Объекты исследования

2.2 Методы исследования

2.2.1 Методика приготовления питательных сред для культивирования микроорганизмов

2.2.2 Выделение чистой культуры методом разведений

2.2.3 Посев на агаризованные среды в чашки Петри

2.2.4 Изучение морфологии бактерий

2.2.5Методика изучения культуральных свойств

2.2.6 Метод раздавленной капли

2.2.7Определение липолитической активности

2.2.8 Приготовление бактериальной суспензии

2.2.9 Определение общего количества микроорганизмов (КОЕ)

2.2.10 Определение мутности

2.2.11Определение кислотности

2.2.12 Определение активной реакции среды

2.2.13 Биуретовый метод определения белка по Ярош

2.2.14Метод определения протеолитической активности (ПС) Вильштеттера и Вальдшмидт-Лейтца в модификации

2.2.15 Определение активности липазы (ЛС) (модифицированный

метод Ота, Ямада)

2.2.16Определение концентрации взвешенных веществ

2.2.17 Определение содержания органических веществ

2.2.18 Отбор проб методом асимметрической бахромы

2.2.19 Определение колористических показателей волосяного покрова

2.2.20 Определение содержания несвязанных жировых веществ (ГОСТ 26129-84 Шкурки меховые и овчина шубная выделанные. Методы определения несвязанных жировых веществ)

3 Экспериментальная часть. Изучение способности микроорганизмов деструктировать жировые вещества различной химической природы

3.1 Восстановление и исследование морфолого-культуральных свойств микроорганизмов, деструктирующих жировые вещества

3.2 Изучение толерантности исследуемых культур к факторам внешней среды

3.3 Проведение процесса обезжиривания меховой овчины с применением бактериальной суспензии

4 Экономическая часть. Расчет экономической эффективности экобиотехнологического процесса обезжиривания меховой овчины

5 Безопасность жизнедеятельности

6 Охрана окружающей среды. Биологическая очистка сточных вод кожевенных и меховых предприятий

Заключение

Список использованных источников информации

Приложение А Морфолого-культуральные свойства микроорганизмов, деструктирующих жировые вещества

Приложение Б Акты о производственных испытаниях

**Введение**

Применение микробиологических технологий в мире получает все большее распространение. Как свидетельствуют аналитические прогнозы, одними из самых прогрессирующих технологий нового тысячелетия, которое у большинства из нас ассоциируется прежде всего с компьютерами, сверхмощными двигателями, автоматикой и телемеханикой, будут технологии микробиологические. В них главными «машинами» служат живые существа (бактерии, дрожжи, лучистые и плесневые грибы), имеющие такие маленькие размеры, что увидеть их невооруженным глазом невозможно. Невидимые параллельные нашему миру организмы повсюду окружают нас. В настоящее время требования к продукции предприятий легкой промышленности возросли. Кроме того предприятия должны выпускать конкурентоспособную продукцию и обеспечить экологическую безопасность окружающей среды от возможных отрицательных последствий, оставаясь кредитоспособными и иметь высокие показатели экономической эффективности производства. Все это ведет к тому, что руководители производства стремятся внедрять те технологии выработки, которые позволяют получать полуфабрикат с высокими показателями качества, соответствующие ГОСТам, выработанный с минимальными затратами труда, химических материалов и времени.

В настоящее время наиболее перспективным является использование биотехнологических методов, основанных на применении микроорганизмов, что позволит уменьшить уровень токсического загрязнения образующихся сточных вод. Возможность применения препаратов на основе прокариотических организмов для технологических процессов мехового производства позволит значительно снизить количество детергентов и ксенобиотиков в сточных водах, за счет первоначального их сокращения при выполнении технологических процессов.

В связи с этим целью работы являлось изучение микробной деструкции жировых веществ, содержащихся в волосяном покрове и кожевой ткани овчинно-шубного, мехового сырья и разработки технологической карты проведения биотехнологического обезжиривания.

**1 Литературный обзор. Жировые вещества и современные способы их удаления и утилизации**

Жиры очень распространены в природе. Они представляют собой смесь разных по составу триглицеридов жирных кислот. Из всех известных липидов жиры являются самой большой группой [1].

В натуральных жирах содержится около 95-97 % глицеридов жирных кислот, а после рафинации содержание их повышается до 98,5-99,5 %. В состав смеси входит также некоторое количество сопутствующих веществ - фосфатидов, стеринов, восков, продуктов гидролиза глицеридов и др.[2].

Такую сложную смесь в природных жирах, выполняющую важную физиологическую и биохимическую роль в живых организмах, называют липидами.

Липиды плохо растворяются в воде, но хорошо растворяются в большинстве гидрофобных органических растворителей. Исключение составляют фосфолипиды, которые в отличие от глицеридов плохо растворимы в ацетоне. Липиды взаимно растворяются и при извлечении из тканей растений и животных организмов они вместе составляют продукт, называемый сырым жиром [3].

Жиры являются одним из основных продуктов питания. Они служат также основным сырьем для жироперерабатывающей промышленности в производстве мыла, олифы, глицерина, используются в качестве добавок к лекарственным средствам, для строительных растворов, бетона, а так же широко используются в кожевенно-меховой промышленности.

Жиры входят в состав животных и растительных организмов. У растений жир содержится главным образом в семенах, причем у злаковых - в зародыше. Содержание жира в семенах различных растений колеблется в широких пределах [4].

Микробная липаза способна гидролизовать животные жиры, растительные масла, а также синтетические моно-, ди- и триглицериды. Синтетические триглицериды являются лучшими субстратами для многих микробных липаз.

При микробной деструкции жировые вещества распадаются до глицерина и высших жирных кислот, включаясь в дальнейшем в цикл трикарбоновых кислот и образуя конечные продукты распада: углекислый газ и воду [5].

* 1. **Структура жировых веществ**

Жиры являются веществами нелетучими и при нагревании до 250-300°С разлагаются с образованием летучих веществ, выделяющихся в виде паров, газов и дыма. Жиры плохие проводники тепла. По сравнению с углеводами и белками они обладают вдвое большей теплотой сгорания. Так, 1 г жира при полном сгорании выделяет 39,8 кДж тепла, тогда как такое же количество углеводов - 17,2, белков - 23,0 кДж. Жиры принадлежат к веществам с низким поверхностным натяжением (для большинства жиров 30 **×**10 –3 -37**×**10-3 Н/м на границе с воздухом; для воды - около 73**×**10-3 Н/м). Благодаря небольшому поверхностному натяжению жиры могут проникать в капиллярные каналы, чем объясняется подъем их по фитилю свечи и образование прозрачного масляного пятна на бумаге. Жиры плохие проводники электричества. Их электропроводность увеличивается при прогоркании и при возрастании содержания жирных кислот [1].

Классификацию жиров производят по различным признакам. В первую очередь их разделяют в зависимости от природы их происхождения на жиры животных и растительные. Каждая из этих групп в зависимости от количественного содержания твердых глицеридов, подразделяется на жиры жидкие при нормальной температуре (20°С) и жиры твердые. Жиры животного происхождения делят на:

а) жиры наземных животных;

б) жиры молока;

в) жиры птиц;

г) жиры морских животных и рыб;

д) жиры земноводных и пресмыкающихся. [6].

Липиды – большая группа природных веществ, разнообразных по химической структуре и физико-химическим свойствам. Имеется несколько трактовок понятия липиды и различных схем их классификации, основанных на свойствах этих веществ. Общее свойство липидных соединений – способность растворяться в эфире, хлороформе и других органических растворителях (но не в воде) [7].

Липиды по строению можно подразделить на две большие группы. 1. Простые липиды, или нейтральные жиры, представленные у большинства организмов ацетилглицеринами, т.е. глицериновыми эфирами жирных кислот (свободные жирные кислоты встречаются в клетках лишь как минорный компонент). 2. Сложные липиды, к которым относятся липиды, содержащие фосфорную кислоту в моно - или диэфирной связи, – это фосфолипиды, в число которых входят глицерофосфолипиды и сфинголипиды. К сложным липидам относятся соединения, связанные гликозидной связью с одним или несколькими остатками моносахаридов, или гликолипиды, а также соединения стероидной и изопреноидной природы, в том числе каротиноиды [8].

Первое доказательство того, что липиды содержат физиологически необходимые для высших животных соединения, получено в 1926 г. голландскими исследователями Ивансом и Буром. Несколько позднее было установлено, что этими соединениями являются полинасыщенные жирные кислоты (линолевая, линоленовая и арахидоновая) – физиологически необходимые для большинства живых организмов (витамин F).

В дальнейшем было установлено, что и в клетках микроорганизмов липиды выполняют самые различные биологические функции. Они входят в состав таких ответственных структур, как клеточная мембрана, митохондрии, хлоропласты и другие органеллы. Липопротеиновые комплексы играют важную роль в процессах метаболизма. С ними в значительной мере связаны активный перенос различных веществ через пограничные мембраны и распределение этих веществ внутри клетки. С составом липидов во многом связаны такие свойства организмов, как термотолерантность и термофильность, психрофильность, кислотоустойчивость, вирулентность, устойчивость к ионизирующей радиации и другие признаки. Кроме того, липиды могут выполнять функцию запасных продуктов. К таковым относятся, поли-β-гидроксимаслянная кислота, образуемая многими бактериями, и ацетилглицерины, в частности триацетилглицерин, накапливаемые в больших количествах некоторыми дрожжами и другими представителями грибов [9].

В состав природных липидов входят остатки длинноцепочечных спиртов с четным числом атомов углерода. Кроме того, высшие спирты, принимающие участие в образовании молекул липидов, чаще всего имеют неразветвленную углеродную цепь и могут быть как насыщенными, так и ненасыщенными. Наиболее распространены следующие виды спиртов: глицерин – трехатомный спирт, наиболее широко встречающийся полиол в липидах, входит в состав нейтральных липидов и фосфолипидов; диолы – двухатомные спирты, обнаружены и выделены из различных природных источников, входят в состав полярных липидов, распространены значительно меньше, чем глицерин; миоинозит (мезоинозит, i-инозит) – шестиатомный циклический спирт, найден в составе липидов растительных и животных тканей.

В составе липидов различного происхождения найдены разнообразные углеводные молекулы, относящиеся к различным классам моносахаридов: гексозы, аминогексозы, дезоксигексозы и др. [10].

Распад нейтральных липидов происходит за счет гидролитического действия липаз. Распад приводит к образованию глицерина и жирных кислот, иногда фосфатов и аминоспиртов.

Глицерин, образующийся в этой реакции, фосфорилируется до глицеро-1-р, дегидрируется до диоксиацетон-р и участвует дальше в процессах гликолиза.

Наиболее важную роль при распаде органических веществ играют ферменты – биокатализаторы, образующиеся в клетке и представляющие собой либо простые белки, либо сложные, содержащие не аминокислотные компоненты. Коферменты часто участвуют в переносе электронов или функциональных групп. Как и витамины, они входят в качестве необходимого компонента в пищу и не могут синтезироваться по крайней мере, в органах высших организмов.

При распаде жирных кислот в результате β-окисления на первой стадии, жирные кислоты активируются реакцией с коферментом А (НS-CoA) в присутствии молекулы аденозинтрифосфата (АТФ). Образующийся ацил-СоА постепенно окисляется при помощи дегидрогеназ и гидротаз до β-окси и β-кетокислот, из которых молекула ацетил-СоА («активная уксусная кислота») образуется под действием другой молекулы кофермента СоА со свободной SH-группой. Таким образом, молекула жирной кислоты распадается в конце концов до продуктов, имеющих всего два углеродных атома, превращающихся в цикле трикарбоновых кислот.

Ацетил-СоА является ключевым промежуточным соединением в превращении всех питательных веществ. Образуется в аэробных условиях из сахаров, аминокислот, липидов (при β-окислении и при гидролитическом распаде глицерина).

Восстановленные коферменты постепенно окисляются в дыхательной цепи с постепенным образованием макроэргических фосфатов. С точки зрения образования АТФ, окисление жирных кислот составляет основной энергетический резерв организма. Если для эукариотов β-окисление происходит в митохондриях, то для прокариотических организмов этот процесс протекает в цитоплазматической мембране [11].

В организме жиры локализованы в жировых клетках и характеризуются высокой скоростью метаболизма. Приведем реакцию β-окисления жирных кислот:

Н3С-СН2-СН2(СН3)-СОSCoA СH3-CH=C(CH3)-COSCoA CH3-CH(OH)-C(CH3)-COSCoA CH3-CO-C(CH3)-COSCoA -OOC-CH(CH3)-COSCoA -OOC-CH2-CH-COSCoA Сукцинат

В конечном итоге жирная кислота окисляется до сукцината [12].

В целом, окисление липидов можно представить следующей схемой, представленной на рисунке 1

Липиды

Жирные кислоты, глицерин

Ацетил-СоА

Оксалоацетат Цитрат

Малат Изоцитрат

Фумарат α-Кетоглутарат

Сукцинат

Рисунок 1 – Окисление липидов в цикле Кребса

Первая стадия в биосинтезе липидов, содержащих жирные кислоты, — образование эфиров жирных кислот и кофермента А. Весь гомологический ряд жирных кислот с длинной цепью, содержащих чётное число углеродных атомов, образуется в результате реакций, называемых малонил-СоА. В этих реакциях к исходной молекуле ацетил-СоА последовательно добавляется звено С-2. Приведём суммарную реакцию синтеза пальметил-СоА:

7СООН—СН2—СО—SКоА + 14НАДФН2 СН3(СН2)14СООН +

+ 7СО2 + 8КоАSН + 14НАДФ + 6Н2О

При первой реакции образуется малонил-СоА (путей синтеза несколько). Один из путей — реакция, катализируемая биотинсодержащим ферментом ацетил-СоА-карбоксилазой:

Н—СН2—СО—SКоА + СО2 + АТФ НООС—СН2—СО—SКоА+АДФ + Фн

У дрожжей система синтеза жирных кислот представляет собой гомогенный многоферментный комплекс с молекулярной массой около 2-3 млн. (так называемая синтетаза жирных кислот).

Образование жирных ненасыщенных кислот у аэробных микроорганизмов происходит по следующей схеме:

СН3(СН2)14—СО—SСоА пальметил-СоА

О2 НАДФН2

СН3(СН2)5СН = СН(СН2)7 —СО—SСоА пальмитолеил-СоА

Дополнительные двойные связи могут быть введены в эфир СоА и мононенасыщенной кислоты в сходной реакции, которая может быть катализирована тем же ферментом.

У многих бактерий обычный путь образования жирных ненасыщенных кислот — анаэробный, при котором происходит постепенное удлинение уже ненасыщенных предшественников. Кислоты, содержащие циклопропановые кольца, синтезируются путём образования метиленового мостика по месту двойной связи в ненасыщенных кислотах, при этом добавлямый кислород заимствуется из метильной группы метионина в форме S-аденозилметионина. Это добавление имеет место только при включении в фосфолипид с одной двойной связью [13]. Реакция биосинтеза липидов протекает с выделением углекислого газа и смещением равновесия вправо, то есть является термодинамически устойчивым процессом [14].

Одним из промышленно важных ферментов, продуцируемых микроорганизмами, являются липазы, которые интенсивно исследуются во всем мире. Липаза - триглицеридгидролаза - фермент, катализирующий гидролиз жиров, широко распространена в природе. Она присутствует в животных и растительных клетках, а также в микроорганизмах. Экспериментальные исследования свидетельствуют о том, что микробные липазы являются ферментами с широкой специфичностью и большим разнообразием свойств. Свойства липаз и характер липолитической активности даже у одного рода можно различно варьировать. Изучение микробных липаз представляет большой теоретический и практический интерес, так как они могут быть использованы при гидролизе разнообразных жировых субстратов [15].

Липазы катализируют гидролиз жиров и масел с образованием диацилглицеридов, моноацилглицеридов, глицерина и жирной кислоты. Катаболизм включает три основных фазы превращения органических веществ органотрофами. В первой фазе, с помощью экзоферментов бактерии гидролизуют липиды до жирных кислот и глицерина, которые могут легко транспортироваться в цитоплазму. Во второй фазе, поступившие в цитоплазму органические вещества расщепляются до фрагментов, содержащих два-три углеродных атома. В третьей фазе эти соединения окисляются до углекислого газа и воды. Наибольшая часть энергии высвобождается во второй и третей фазах [11].

Липазы можно разделить на две группы: специфичные и неспецифичные. Ферменты из первой группы гидролизуют сложноэфирные связи в первом или втором положении. Многие микробные липазы обычно гидролизуют первичные сложноэфирные связи (α-эфирные связи). В гидролизиатах с участием таких ферментов обычно обнаруживаются жирные кислоты, 2,3- и 1,2-диглицериды, 2-моноглицериды. При более длительных гидролизах жирнокислотный остаток из 2-моноглицерида мигрирует в первое положение с образованием 1-моноглицерида, который легко гидролизуется специфичной липазой с образованием глицерина и жирной кислоты. К этой группе относятся липазы из Rhizopus arrhizus, Rhizopus delemar, Rhizopus microsporus, Mucor miechei, Aspergillus niger, Pseudomonas sp. и т.д. Липазы второй группы не различают эфирные связи во всех трех положениях триглицеридной молекулы и способны подвергать субстрат тотальному гидролизу. В гидролизатах триглицеридов с участием этих видов липаз обнаруживаются, как правило, остатки триглицеридов (негидролизованная часть), глицерин и жирные кислоты. Такие липазы были выделены из Geotrichum candidum, Oospora lactis, Humicola lanuginosa и т. д. Активность липаз зависит от длины цепочки и степени насыщенности жирной кислоты. Дженсон описал, что липаза Geotrichum candidum проявляла высокую специфичность к олеиновой и линолевой кислотам независимо от их положения в молекулах триглицеридов. Такими же свойствами обладают липазы из Achromobacter lipolyticum, тогда как липаза из Aspergillus niger проявляла большую специфичность к стеариновой кислоте и молекулам субстратов [16].

Важное значение при исследовании жиров приобрели спектральный метод, метод радиоактивных изотопных индикаторов, молекулярные перегонки и др. Все они представляют интерес, так как для их осуществления требуется очень небольшое количество исследуемого материала, а точность результатов очень высока.

Спектральный анализ при исследовании жиров проводят в видимой области спектра с длиной волн 400—750 нм, в ультрафиолетовой области с длиной волн 200—400 нм и в инфракрасной области с наибольшей длиной волн 2000—15000 нм.

Спектральный анализ применяется для количественного определения в жирах ненасыщенных кислот, некоторых продуктов окисления жира, синтетических ингибиторов окисления жиров и для многих других целей.

В состав большинства натуральных жиров и масел входят ненасыщенные кислоты с изолированными двойными связями. Поэтому для определения содержания в них линолевой и линоленовой кислот смесь кислот изомеризуют.

Инфракрасная спектрометрия применяется для установления деталей строения структурных элементов жиров, строения сопутствующих жирам веществ, для определения содержания в гидрированных и модифицированных жирах транс-изомеров олеиновой кислоты, для определения содержания первичных и вторичных спиртов в смеси и для других целей.

Хроматография — метод разделения веществ, заключающийся в пропускании газовых смесей или растворов через слой пористых сорбирующих материалов.

Хроматографический анализ получил большое применение для разделения и количественного определения сопутствующих жирам веществ, жирных кислот, продуктов окисления жиров, высокомолекулярных жирных спиртов и для многих других целей.

В области исследования жиров наиболее широко распространены адсорбционная и распределительная хроматография. В последнее время широкое распространение в исследовании липидов получила газо-жидкостная хроматография.

Газо-жидкостная хроматография отличается от других видов распределительной хроматографии в основном тем, что в качестве подвижной фазы используется инертный газ (гелий, водород), а неподвижной фазой является жидкость, нанесенная на твердый носитель. Разделение смеси на индивидуальные вещества производится в колонке, заполненной порошком, например, кизельгуром, цеолитом, равномерно пропитанным небольшим количеством нелетучей жидкости, служащей неподвижной фазой.

С помощью газожидкостной хроматографии можно с большой точностью анализировать смеси метиловых эфиров насыщенных и ненасыщенных жирных кислот, смеси жирных спиртов и других веществ [6].

**1.2 Современные методы обезжиривания**

Обезжиривание — один из основных процессов производства меха. Значение обезжиривания для мехового производства велико: на поверхности волосяного покрова и в кожевой ткани шкурок некоторых видов животных (овец, нутрий, сурков, тюленей, ондатр, морских котиков и т.д.) содержится значительное количество жироподобных веществ. Высокое содержание жироподобных веществ в волосяном покрове является причиной дефектов крашения (непрокрас, пятнистость), ухудшения блеска и рассыпчатости волосяного покрова, а наличие большого количества жира в кожевой ткани в определенных условиях приводит к его окислению и снижению прочности кожевой ткани.

Установлено, что после отмоки па волосяном покрове меховых шкурок содержится значительное количество липидов. Загрязнений белковой и углеводной природы [17]**.**

Обезжиривание должно вестись до содержания жира в волосе в пределах 1,5-2 % (считая на влажность 0%). При более низком содержании жира ухудшаются физико-механические свойства волоса, появляются хрупкость и ломкость, снижается устойчивость его к истиранию.

Известно несколько методов обезжиривания:

Адсорбционный метод основан на применении высокодисперсных твердых адсорбентов (специальных глин). Мельчайшие частицы глины обволакиваются капельками жира и удаляют его. Этот метод малопроизводителен, поэтому почти не применяется [18].

Обезжиривание растворителями – экстракция полуфабриката растворителями жира (дихлорэтаном, бензином, уайт - спиритом, скипидаром). Достоинством этого метода является высокая степень обезжиривания дермы, гарантия от теклости волоса. Однако относительно высокая стоимость растворителей, их токсичность и сложность аппаратуры ограничивают применение этого метода. Кроме того, шерсть очень сильно адсорбирует растворитель. Разрабатываются методы обезжиривания водными эмульсиями жирорастворителей.

Эмульсионный метод обезжиривания имеет наиболее широкое применение как в меховой, так и в кожевенной промышленности. Он основан на использовании моющей способности ПАВ: ОП-10, сульфанола НМ-3, сапонина, мыла, порошка и пасты «Новость» и др. [19].

Ферментативный метод обезжиривания волосяного покрова овчины осуществляется с помощью таких ферментных препаратов, как липазин, липаваморин Г-3х и липопротеидлипаза [18].

В основном их применяют с целью придания кожевой ткани меха мягкости и пластичности за счет удаления межволоконных веществ, в частности белков, углеводов и их комплексов. Основные проблемы и трудности проведения обезжиривания с использованием ферментов заключаются не только в ослаблении связи волосяного покрова с дермой, но в том, что в рабочем растворе присутствуют синтетические поверхностно-активные вещества (СПАВ) и формальдегид, которые вызывают снижение активности применяемых ферментных препаратов.

В современных методах обезжиривания основное внимание уделяется только технологической стороне процесса, а именно, степени удаления жировых веществ с поверхности волосяного покрова и кожевой ткани. При этом не учитывается уровень техногенного воздействия, оказываемого на окружающую среду и, в частности, на водные объекты. Высокая токсичность сточных вод после процесса обезжиривания обусловливается присутствием в них СПАВ и формальдегида.

Для выполнения работы была использована культура рода Pseudomonas sp., выделенная из сточной воды после эмульсионного метода обезжиривания меховой овчины. Чистую культуру поддерживали на синтетических, элективных, агаризованных питательных средах, ее введение осуществляли в соответствии с общепринятыми микробиологическими методами [20].

Биотехнологическое обезжиривание проводили в течение 1 ч при температуре (40+0,5)ОС при переменном механическом воздействии. Для испытаний использовали состав, содержащий неионогенный СПАВ - Превоцелл W-ОF-7 - 0.12 г/дм3; бактериологический препарат - 2.5 г/дм3; с активностями протеолитической - 212 ед./г и липолитической - 11,42 ед./г; биомассой микробных продуцентов 36х104 клеток/см3. В опытный состав не вводили формальдегид и карбонат натрия. В качестве контрольного варианта было проведено обезжиривание по типовой методике. Полученный после опытного обезжиривания полуфабрикат характеризовался белым, чистым, рассыпчатым волосяным покровом. Содержание органически вымываемых веществ в кожевой ткани и волосяном покрове после опытного обезжиривания составило 13,87 и 2,0% соответственно.

При этом не обнаруживается заметного негативного воздействия на связь волоса с дермой, которая составила после биотехнологического обезжиривания 6.66 Н.

Для оценки уровня токсического загрязнения (УТЗ) [21] было проведено исследование сточной воды после обезжиривания осуществленного по типовой и разработанной методикам. В качестве тест-объекта использовали рачки Daphnia magna Straus. Показателем степени токсичности являлась кратность разбавления. при котором устраняется острое токсическое действие.

Сточные воды после процесса биотехнологического обезжиривания менее токсичны и могут быть отнесены к умеренно загрязненным, в то время как стоки, образующиеся после типового обезжиривания и содержащие СПАВ, формальдегид, относятся к очень грязным. Это подтверждается 100%-й гибелью рачка Daphnia magna Straus [22].

Авторами Бреслером С.М., Пуримом Я.А., Савиной М.В предложен состав для обезжиривания меховых овчин с применением натриевой соли моноэфира серной кислоты и смеси цетилового и олеилового спиртов, формалина, карбоната натрия и воды. Дополнительно содержит перекись водорода и неионогенное поверхностно-активное вещество при следующем соотношении компонентов, г/л:

Натриевая соль моноэфира серной кислоты и смеси цетилового и олеинового спиртов - 0,2-2,5;

Формалин (в пересчете на 100%-ную концентрацию) – 0,12-0,28;

Карбонат натрия – 0,2-0,7;

Перекись водорода (в пересчете на 100%-ную концентрацию) – 0,3-1,5;

Неионогенное поверхностно-активное вещество – 0,2-0,5;

Вода – остальное.

Благодаря введению в обезжиривающий состав активатора – перекиси водорода, достигается интенсивность очистки волосяного покрова от жировых и механических загрязнений. Неокрашенный полуфабрикат овчины, обработанный предложенным составом, отличается более чистым и рассыпчатым волосяным покровом, чем полуфабрикат, обработанный составом по прототипу. Прототип – Единая технология обработки меховых овчин. ЦНИИТЭИлегпром, 1978 [23].

С целью повышения сортности, чистоты волосяного покрова, мягкости кожевой ткани, равномерного окрашивания Пуримом Я.А., Корольковой Е.А. было предложено дополнительное введение ферментного препарата – протосубтилин Г3х-1 0,8-1г/л.

Изобретение испытано в полупроизводственных условиях на целых овчинах и сопоставительных половинках и дало положительные результаты. Кроме исключения использования неионогенного ПАВ достигнуто улучшение качества волосяного покрова. Опытные половинки имели более чистый, рассыпчатый, равномерно окрашенный волосяной покров и более мягкую, пластичную кожевую ткань [24].

Л.А. Комиссаровой в процессах мойки и обезжиривания овчин использовался ферментный препарат протеолитического действия протосубтилин ГЗх с целью воздействия его на белковые составляющие загрязнений, оболочки жировых клеток и межволоконные белки. Было исследовано влияние компонентов моющих и обезжиривающих растворов, а также различных их сочетаний на протеолитическую активность; ферментного препарата протосубтилина ГЗх, определенную по методу Лейлян – Фольгарда при стандартной температуре 37° С и при температуре 42°С, оптимальной для мойки и обезжиривания, которая соответствует температуре плавления шерстного воска.

Разработанный процесс мойки — обезжиривания с применением протосубтилина ГЗх для овчин в производстве меха имел меньшую продолжительность, и ферментный препарат использовался при более низких концентрациях (с учетом активности), чем при производстве кожи с применением формальдегида, т.е. при действии протеолитического ферментного препарата создавались более «мягкие» условия во избежание нарушения связи волоса с дермой и повреждения волоса.

Эта технология испытана с положительными результатами в производственных условиях Каунасского производственного мехового объединения им. К. Гедриса. Применение протосубтилина ГЗх для мойки и обезжиривания овчин позволяет интенсифицировать технологический процесс, сократить длительность и трудоемкость обработки, снизить расход воды, пара, химических материалов, электроэнергии, улучшить качество полуфабриката, уменьшить объем сточных вод.

К недостаткам данной технологии следует отнести присутствие в обрабатывающем растворе формальдегида, который применяется с целью упрочнения связи волоса с кожевой тканью, ввиду того что ферментный препарат протосубтилин ГЗх действует в слабощелочной среде и в определенных условиях обладает обезволашивающей способностью.

Совмещенное проведение процессов отмоки – мойки— обезжиривания способствует интенсификации технологического процесса, уменьшению расхода электроэнергии, воды, пара, химических материалов, объема сточных вод, улучшению качества полуфабриката [25].

Интересно использование для обезжиривания мехового сырья ферментного препарата бактериального происхождения – липопротеидлипаза. Применение ее позволяет повысить производительность труда, сократить длительность производственного цикла, уменьшить расход воды, пара, снизить загрязненность сточных вод (за счет исключения ПАВ). Однако этот ферментный препарат не нашел применения в меховом производстве в связи с его высокой стоимостью, а также потому, что он был получен в малых количествах в лабораторных условиях в виде сиропа и его активность резко снижалась при хранении.

В институте микробиологии им. Августа Кирхенштейна АН Латвийской ССР разработан ферментный препарат липаза, продуцентом которого является культура Sacharomycopsis lypolytica. Активность препарата 100000 ед./г, оптимальные условия действия при рН – 7-8, температуре 37-420С. В 1986г. На Алма-Атинском меховом комбинате им. 50-летия СССР была внедрена технология обработки меховой овчины с применением в процессе обезжиривания ферментного препарата липазы, что позволило интенсифицировать этот процесс, сократить расход пасты «Новость», улучшить качество готового полуфабриката [17]**.**

Интересна работа С.В. Чесунова и Л.Л. Щеголевой. Сущность изобретения заключалась в том, что состав для обезжиривания меховых овчин, включающей порошок «Новость», карбонат натрия, формальдегид и воду, дополнительно содержал глутаровый альдегид (в пересчете на 100%-ную концентрацию) 0,38-0,75г/л. Введение глутарового альдегидав раствор для обезжиривания дало возможность получить полуфабрикат высокого качества с чистым рассыпчатым волосяным покровом, способствовало улучшению качества кожевой ткани, повышению ее мягкости, пластичности, способствовало лучшему использованию сырья [26].

Казанским государственным технологическим университетом была представлена работа по применению поверхностно-активных веществ на основе побочных продуктов производства в обезжиривающих и моющих составах производства овчины меховой.

Известно, что моющие и особенно обезжиривающие составы являются многокомпонентными системами, в состав которых входят как анионактивные, так и неионогенные ПАВ, а также другие добавки.

Проблему совместимости анионактивного ПАВ и синтезированных карбоксилатаминов удалось решить, благодаря двойственному характеру последних, способных проявлять как катионактивные, так и неионогенные свойства. Наличие катионактивной формы олеинатамина (ОЛТА) и флотатамина (ФЛТА) подтвердилось данными ИК-спектроскопии

Обезжиривающая и моющая способность ПАВ тесно связана с адсорбцией его на поверхности волоса или кожевой ткани шкуры. Особенностью применения ПАВ в данном случае является то, что адсорбция осуществляется на твердой поверхности. В отличие от жидких сред положение атомов на поверхности твердого тела фиксировано. Адсорбция проходит не на всей поверхности, а лишь в ее активных центрах. Применение в обезжиривающих эмульсиях ситезированных карбоксилатаминов, имеющих в своем составе активные метилольные и сложноэфирные группы, способные взаимодействовать с функциональными группами коллагена и кератина, повышает эффективность обезжиривания. Контроль обезжиривания осуществлялся качественно по реакции Либермана. Количественно содержание жира определялось экстрагированием дихлорэтаном [7].

Установлено, что оптимальными обезжиривающими свойствами обладает эмульсия, содержащая в своем составе 4% ФЛТА, рабочая концентрация которой 5г/дм3. Остаточное содержание жира после обработки образцов указанным составом не превышает 1,9% [27].

Известно применение оролона – препарата поджелудочной железы – при обработке меховых овчин на фабрике «Паннония» (Венгрия). Ферментативную обработку совмещали с обезжириванием, то есть ферменты использовали в щелочной среде при рН выше 7,5. После ферментативной обработки проводили сернокислое пикелевание. Качество кожевой ткани получилось примерно таким же, как при хлебной выделке [28].

Важное значение при производстве мягких кож имеет обезжиривание сырья, так как повышенное содержание природного жира в свиных шкурах отрицательно сказывается на проведении последующих процессов. При этом равномерного воздействия щелочных, ферментных, кислотных, дубящих и других реагентов непосредственно на структурные элементы дермы не обеспечивается, что проявляется в повышенной жесткости готовой кожи. Наиболее эффективным является обезжиривание в отмочно-зольных и преддубильных процессах посредством механического и химического обезжиривания сырья и полуфабриката, в результате чего удается снизить содержание природного жира в хромированном полуфабрикате до 1 % и ниже [29].

Микаэлян И.И., Меньшиковой Л.М. предложено обезжиривание свиного сырья с целью повышения качества обработки. Указанная цель достигалась тем, что состав для обезжиривания включающий кальцинированную соду, поверхностно-активное вещество и воду, содержал в качестве поверхностно-активного вещества алкилдиметилбензиламмонийхлорид, при следующем соотношении компонентов, г/л:

Кальцинированная сода – 3-15

Алкилдиметилбензиламмонийхлорид – 0,3-1,0

Вода – Остальное

Кроме того, с целью ослабления связи щетины с дермой, состав дополнительно содержит сернистый натрий при следующем соотношении компонентов, г/л:

Кальцинированная сода – 10-15

Алкилдиметилбензиламмонийхлорид – 0,3-0,5

Сернистый натрий – 0,3-0,5

Вода – Остальное

Введение в состав алкилдиметилбензиламмонийхлорида (катамина АБ) активизировало обезжиривающие свойства кальцинированной соды, что позволило повысить качество обезжиривания, облегчило проведение дальнейших жидкостных процессов обработки свиного сырья [30].

Поскольку процесс обезжиривания свиных шкур с применением панкреатических ферментов изучен недостаточно, авторами В.А.Валейкене, Г.С.Симанайтите, А.А.Скродянис (Каунасский политехнический институт имени Антанаса Снечкуса) были проведены исследования обезжиривания свиных шкур таким препаратом – техническим панкреатином. Как известно, панкреатин кроме протеолитического имеет и другое действие. Находящаяся в его составе липаза вызывает гидролиз жира. Такая ферментативная обработка позволяет уменьшить количество жира в свиных шкурах на 35-45%. Причем после предварительных обработок структурные элементы дермы становятся более доступными для действия панкреатина.

Установлено, что при обработке щелочной бактериальной протеазой катионные и анионные ПАВ ингибируют активность ферментов, в то время как неионогенные ПАВ не оказывают отрицательного эффекта.

В процессе исследований были получены данные оптимального состава обезжиривающей ванны. Обезжиривание свиных шкур целесообразно проводить путем совмещенной обработки техническим панкреатином – 0,8 % от массы парного сырья, неионогенным ПАВ – 5г/л в течение 5-6ч. Во время обработки удаляется около 80 % жира, оставшееся количество жира после обработки составляет около 2 % [31].

Обезжиривание коллагенсодержащего сырья было представлено Чистяковым Б.Е., Полковниченко И.Т. Цель изобретения – осуществление одновременного отбеливания сырья и повышение интенсивности его обезжиривания. Это достигалось тем, что в качестве поверхностно-активного вещества состав содержит смесь соли алкилфосфатов на основе высших жирных спиртов С10-С20 и синтанола при следующем соотношении компонентов, вес.%:

Сода – 2-50

Соль алкилфосфатов на основе высших жирных спиртов С10-С20

Синтанол – 20-60

Вода – Остальное

В качестве поверхностно-активных веществ используют триэтаноламиновые или калиевые соли алкилфосфатных кислот на основе высших алифатических первичных или вторичных спиртов.

Проведенные испытания показали, что использование предлагаемого состава дает в сравнении с известным составом больший обезжиривающий эффект с одновременным отбеливанием кетгута (хирургического шовного материала). Известный состав отбеливающим действием практичеси не обладает [32].

Авторами Фехретдиновым П.С., Угрюмовой В.С. предложено средство для обезжиривания коллагенсодержащего сырья, преимущественно кишечного. Для обработки сырья использовалось в качестве поверхностно-активного вещества препарат ф-761, представляющий собой N,N-диметил-N-алкил-N-[изононилфеноксидека(этиленокси)карбонилметил]аммоний хлорид фракции С10-С16. Полученные результаты, после испытания свидетельствовали о значительном повышении интенсивности обезжиривания коллагенсодержащего сырья предлагаемым препаратом ф-761, а также об улучшении технологичности его переработки по сравнению с прототипом [33].

Работа Е.М. Харчуткиной, Е.П. Болдовской, О.В. Дормидонтовой посвящена оптимизации ферментативной отмоки обезжиривания шкур угря. Показана целесообразность последовательного введения липазы в обрабатывающую жидкость.

Шкуры угря по сравнению со шкурами других видов рыб имеют наиболее сложное гистологическое строение, что определяет необходимость специфической их обработки с целью получения кож.

Для разработки методики отмоки-обезжиривания шкур угря были выбраны ферментные препараты липаза флюозим ГЗх, обеспечивающая достижение хорошего обезжиривающего и отмачивающего эффекта, и протеаза Прок, способствующая обводнению шкур.

Однако результаты разведывательного эксперимента показали, что при проведении обработки с использованием одной липазы или одной протеазы происходит разрушение эпидермиса и пигментного слоя, расположенного под эпидермисом, которое приводит к получению размытого рисунка лицевой поверхности.

При изыскании эффективного способа отмоки-обезжиривания шкур угря, позволяющего сохранить рисунок лицевой поверхности, было сделано предположение о возможности совместного использования липазы и протеазы, однако при одновременном дозировании ферментных препаратов активность системы меньше суммарной активности отдельно взятых препаратов.

Анализируя варианты введения ферментных препаратов в раствор, можно сделать вывод о том, что совместное использование липазы флюозим Г3х и протеазы Прок возможно лишь при условии их поочередного введения.

Таким образом, для получения кож из шкур угря рекомендуется технология, предусматривающая отмоку - обезжиривание в водном растворе липазы флюозим Г3х и протеазы Прок при их последовательном введении. Это позволило получить кожевенный полуфабрикат с сохранением специфического рисунка лицевой поверхности, хорошими прочностными и упруго-пластическими свойствами [34]**.**

* 1. **Очистка сточных вод от жиров**

В настоящее время возросла проблема загрязнения водного бассейна производственными сточными водами, содержащими различные компоненты, в том числе, жировые вещества. Органические компоненты, поступая в водоем, создают благоприятную среду для жизнедеятельности гнилостных патогенных бактерий, грибков, простейших, подвергаются сложным биохимическим превращениям, вызывая тем самым вторичное загрязнение водоемов и оказывают прямое отрицательное влияние на водные организмы.

На практике используются физические, электрические, биологические, химические методы очистки сточных вод, в том числе озонирование, мембранный метод, обратный осмос и др.

При рассмотрении деструкции органического вещества в водоемах Романенко В.И. и Кузнецов С.И. [35] отмечают, что при деструкции в олиготрофных водоемах (при избытке кислорода) происходит аэробный распад с выделением углекислоты и воды. В анаэробных условиях практически все органические вещества разрушаются с образованием углекислоты, воды, водорода, жирных кислот и других веществ. Во вторую фазу происходит распад жирных кислот до метана и углекислоты и, наконец, образование метана из водорода и углекислоты.

Механизмы анаэробного распада органических веществ изучались на экосистемах анаэробных реакторов, донных отложений и почв. Условия свалки хорошо имитируются в лабораторных цилиндрических лизиметрах [36].

Распад биополимеров (углеводов, белков и жиров) начинается с гидролиза, который осуществляют микроорганизмы, имеющие специальные ферменты - гидролазы. Их размножению и распространению по поверхности твердого субстрата способствует вода. Продукты этой реакции потребляются гидролитиками и другими кислотогенными микроорганизмам, в результате чего образуются летучие жирные кислоты (уксусная, пропионовая, масляная), а также водород. Фаза, условно объединяющая гидролиз и кислотогенез, называется кислотогенной. При накоплении жирных кислот понижается pH среды, а при pH < 6.0 конечная метаногенная фаза подавляется [37].

Чрезмерное содержание аллохтонного органического вещества в нативных водных объектах приводит к ухудшению гидрохимических показателей объекта.

У Листкова Л.Л. [38] отмечено, что наличие в сточных водах жировых веществ в больших концентрациях создает трудности в эксплуатации канализационных систем и дальнейшей очистке сточных вод на специальных сооружениях. Поэтому крайне необходимо очистку сточных вод начинать еще до их выпуска с локальных очистных сооружений, так как последующая очистка производится городскими системами, принимающими стоки со строго лимитированными показателями, которые с каждым годом ужесточаются [39].

Жиры в сточных водах могут находиться в четырех агрегатных состояниях: грубодисперсном, тонкодисперсном, эмульгированном (при этом сохраняется устойчивая кинетическая оболочка) и растворенном в зависимости от рН потока.

Следует отметить, что загрязненность сточных вод растворенными и эмульгированными жирами является доминирующей и изменяется в зависимости от характера технологического процесса и наличие в залповых сбросах.

Не зависимо от того, сбрасываются производственные сточные воды в городскую канализацию или обрабатываются на территории самого предприятия, должны быть предусмотрены следующие очистные сооружения; решетка, песколовка, жироловка и отстойник. При этом решетку и песколовку следует устанавливать перед жироловкой в одном с ней помещении. Количество задерживаемого осадка составит 0,04-0,05 % от объема расхода сточных вод [40].

Из опыта эксплуатации действующих заводских очистных сооружений следует, что жироловки необходимо оборудовать рассредоточенным выпуском и обеспечить время пребывания в ней сточной воды 15 мин при максимальном притоке.

Установлено, что физико-химические методы, в особенности флотация под давлением, являются оптимальным решением, как в техническом, так и в экономическом отношении. Флотация под давлением, без применения реактивов, позволяет уменьшить концентрацию нерастворимых веществ и жира до пределов, предусмотренных Комитетом по охране окружающей среды. Быстрое экстрагирование загрязняющих веществ дает возможность получить продукты, которые можно использовать на кормовые цели [41,42].

Американской фирмой [38] сконструирована многокамерная флотационная система с аэрированием, предназначенная для удаления свободных и эмульгированных жиров и взвесей из сточных вод. Предлагаемая система удаляет 90% и более жиров, масел и взвесей. Высокая эффективность системы обеспечивается четырехступенчатым процессом очистки путем флотации. Она рассчитана на очистку сточных вод, содержащих до 500 мг/дм3 жиров и масел.

В Швейцарии спроектирована акваустановка для утилизации сточных вод, содержащих органические примеси, которые в дальнейшем можно использовать для производства биомассы, что выгоднее по сравнению с типовыми биоочистными установками [43].

На птицеперерабатывающем заводе фирмы (ФРГ) введена в строй крупнейшая флотационная система с блоками опрокидывающих пластин предназначенная для очистки технологической и промывной воды, содержащей кровь, белок, жир и твердые примеси. В результате работы установки БПК снижается на 80%, содержание твердых примесей – на 95%, жира – на 95%. Специальной конструкции скребки собирают и удаляют всю всплывшую массу, причем ее частично обезвоживают и перерабатывают на корм скоту.

В настоящее время помимо физических и физико-химических методов очистки широко применяется биологический метод, основанный на жизнедеятельности микроорганизмов – деструкторов жировых веществ.

Существующие системы очистных сооружений, перерабатывающие сбросы, не обеспечивают полного извлечения жировых веществ, а только позволяют снизить их концентрацию. В этих условиях природная среда, принимая такие не полностью очищенные природные компоненты, выполняет роль утилизатора и нейтрализатора вредных примесей. Во многих случаях природная среда не справляется с все нарастающим потоком загрязнения, и создаются условия для нарушения экологического равновесия обмена веществ в биосфере [44].

В связи с этим стал вопрос о создании технологического производства, которое не вызывало бы экологических возмущений в природной среде.

Аналогом такого производства может служить биологическое природное производство, основу которого составляет функционирование экологических систем. Это биологическая очистка.

Биологическая очистка сточных вод основана на способности микроорганизмов использовать растворенные и коллоидные органические загрязнения в качестве источника питания в процессах своей жизнедеятельности [45]. И она имеет ряд важных преимуществ перед другими методами. Микроорганизмы осуществляют полную деструкцию загрязнения до газообразных продуктов и воды, обеспечивая тем самым круговорот элементов в природе. Таким образом, при биологической очистке в отличие от других способов не происходит концентрации загрязнении или перевода их в другую форму. В то же время биологические методы наиболее экономичны, так как за исключением основных капиталовложений почти не требуют расходов во время эксплуатации сооружений, а главный действующий компонент биологической очистки – активный ил самовоспроизводится [46].

Микроорганизмы-деструкторы предлагается использовать не только для разрушения жировых примесей, но и для нейтрализации других органических веществ, так, английскими исследователями French W.T., Brown L.R. [47] предлагается использовать микроорганизмы вида Burkholderia cepacica в процессе регенерации адсорбентов, применявшихся для выделения трихлорэтилена.

С учетом того обстоятельства, что сточные воды, содержащие жировые вещества имеют в основном повышенную температуру, селектировано несколько видов термофильных микроорганизмов, способных разрушать жиры при температуре свыше 50оС [48]. К таким культурам относятся Acinetobacter species, Rhodococcus species. Эффект очистки при таком способе достигает 100%.

Исследователями из Великобритании предлагается использовать специальное устройство для удаления масел и жиров из сточных вод [49]особенностью такого способа очистки является то, что для деструкции жиров и масел используются специальные культуры микроорганизмов, которые подаются в сточные воды из емкости с содержащей их жидкостью дозатором. Для увеличения эффективности очистки используется эффект флотации: воздух подается в диспергатор на дне.

В больших городах хозяйственно-фекальные сточные воды обычно подвергаются биологической очистке. Для этого служат специальные очистные сооружения аэробного (аэротенки, биофильтры) или анаэробного (метантенки) типа. При наличии мощных городских сооружений сюда же поступают стоки промышленных предприятий, которые смешиваются с бытовыми и проходят совместную обработку. В аэротенках органические загрязнители сточных вод разрушаются микроорганизмами активного ила до простейших продуктов. Активный ил представляет собой комплексный биоценоз, в состав которого входят микроорганизмы, простейшие и некоторые другие живые организмы, не играющие роли в очистке. Одним из важных свойств активного ила является способность образовывать хлопья. Эти хлопья состоят из частиц органических загрязнений, микробов и других живых существ. Благодаря способности к хлопьеобразованию активный ил отделяется от очищенной им воды, оседает и может быть удален из сооружения. Освобожденная от микрофлоры и продезинфицированная вода направляется в природные водоемы [50].

В Финляндии с 1983 года исследуется анаэробная обработка стоков. Проведенные исследования показали, что при продолжительности процесса от 1,7 до 55 суток эффект очистки по химическому потреблению кислорода (ХПК) составляет 77–78 %, снижение БПК – 73-79 %, удаление взвешенных веществ – 94-98 %. Таким образом, с помощью анаэробного метода достигается высокий уровень очистки [51].

Общие стоки кожевенных и меховых предприятий содержат до 1800-2460 мг/дм3 жиров или жироподобных веществ. В стоках от процессов отмоки и дубления их количество достигает более 4 г/дм3. Отработанные жидкости после обезжиривания, промывки свиного сырья и полуфабриката, а также после золения этого сырья содержат еще больше жира. После обезжиривания свиных шкур карбонатом натрия (15-17 г/дм3) в растворе образуется стойкая жировая эмульсия с содержанием жира 8-10 г/дм3. Значительное количество его содержится также в стоках клееварочных цехов. Так на Могилевском кожевенном заводе в стоках указанного цеха содержание жира достигает 8,3 г/дм3 [52].

Для предварительной очистки общего стока от взвешенных веществ, шерсти, сульфидов, жиров, СПАВ, ионов хрома может быть использована технологическая схема двухступенчатой флотационной очистки. Общий сток подвергается механической очистке, усредняется и поступает в камеру подщелачивания, где происходит корректировка рН сточных вод до 9,5-10, куда также подается до 25% реагентов. Далее общий сток поступает во флотационный шерстежироуловитель, работающий по методу безнапорной флотации, камеру хлопьеобразования с корректировкой рН до 8,5 и подачей 75-100% реагента, затем в напорный флотатор. После этого общий сток смешивается с очищенным дубильным стоком и полученная смесь направляется на биологическую очистку. В качестве реагентов возможно использование сульфата железа (11), хлорида жедеза (111) или сульфата алюминия [53].

В Богородском филиале Центрального проектно-конструкторского бюро (ЦПКТЛлегпрома) в лабораторных условиях проверялась возможность разложения отработанных растворов от процессов обезжиривания. Полное и быстрое разрушение этих эмульсий наступало после их подкисления до pН = 3-4. При последующем отстаивании в течение 1,5 - 2 ч. весь жир в виде рыхлой творожистой массы всплывал на поверхность и затем удалялся. Данное загрязнение следует утилизировать, оно может служить исходным сырьем для получения технического жира [40].

Приведенные данные свидетельствуют о том, что присутствие жировых веществ в водоемах нежелательно и решение этого вопроса может быть осуществлено, прежде всего путем совершенствования очистки промышленных выбросов, направляемых в окружающую среду, а также разработка таких технологических процессов и технических устройств, которые позволили бы рационально использовать исходное сырье. И исключили бы попадание вредных веществ в природную среду - речь идет о создании безотходной (малоотходной) технологии.

Таким образом, на основании литературного обзора можно заключить, что жиры играют важную физиологическую и биохимическую роль в живых организмах, являются одним из основных источников энергии. Служат основным сырьем для жироперерабатывающей промышленности в производстве мыла, олифы, глицерина, используется в качестве добавок к лекарственным средствам, для строительных растворов, бетона, а так же широко используется в меховой промышленности.

Также видна необходимость в очистке сточных вод от жировых компонентов. На эту тему проведено множество исследований, в том числе с использованием различных микроорганизмов. Так, липолитически активные организмы используют жиры в качестве источника питания, деструктируя составные жирные кислоты вплоть до альдегидов.

Наиболее эффективным методом очистки сточных вод, содержащих жировые вещества, является биологический способ, который применяется для удаления жиров с помощью микроорганизмов-деструкторов.

В связи с этим есть необходимость в изучении степени вовлечения жировых веществ в конструктивный и энергетический обмен прокариотическими организмами.

**2 Объекты и методы исследования**

Целью дипломной работы являлось изучение способности микроорганизмов деструктировать жировые вещества различной химической природы.

Для выполнения эксперимента был составлен сетевой график, представленный на рисунке 2.

Жировые вещества и современные способы их удаления и утилизации

Объекты и методы исследований

Объекты исследований:

культуры микроорганизмов;

образцы меховой овчины;

шкурки белки и енота.

Методы исследований:

определение морфолого-культуральных свойств, ферментативных свойств, скриннинговые исследования.

Экспериментальная часть:

- восстановление культур микроорганизмов;

- изучение морфолого-культуральных и ферментных свойств;

- проведение скриннинговых исследований;

- производственные испытания.

Экономическая часть

Охрана окружающей среды

Безопасность жизнедеятельности

Заключение

Рисунок 2 – Сетевой график дипломной работы

**2.1 Объекты исследования**

Объектом исследования в дипломной работе являлись микроорганизмы, выделенные из различных природных жиров: нерпичьего (Н), нерпичьего, выращенного на среде с шёрстным жиром (Нв), шерстного (В) и микроорганизмы, выделенные из сточных вод после проведения процесса обезжиривания (3, 8).

Для выполнения работы были использованы следующие химические материалы:

1 Нерпичий жир – жидкость от светло-желтого до темно-коричневого цвета. Получают вытапливанием, экстрагированием, прессованием и сепарированием. В кожевенном производстве используют нерпичий жир с кислотным числом не менее 25.

2 Шёрстный жир –выделяют овцы в виде жиропота в количестве его достигает 5 - 10 % от массы шерсти. Сырой шерстяной жир, выделенный из промывных вод, - густая пастообразная масса бурого цвета. В нем содержатся кроме воска свободные жирные кислоты, глицериды, белки, слизи, красящие вещества, минеральные примеси и пр. Выделенные из шерстяного жира воски с примесью некоторых высокомолекулярных соединений называют техническим ланолином. В очищенном виде этот продукт называется ланолином. Он представляет собой светло-желтое мазеобразное вещество, обладающее высокой гигроскопичностью.

3 Агар-агар – ГОСТ 16280–88 пищевой. Представляет собой порошок белого цвета без постороннего запаха, вкуса. Наличие плесени и видимых посторонних включений не допускается. Физико-химические показатели должны соответствовать требованиям, указанным в таблице 1

Таблица 1 — Физико-химические показатели агар-агара

|  |  |
| --- | --- |
| Наименование показателей | Показатели |
| Цвет студня с массовой долей сухого агара 0,85 %, %, не менее | 45 - 60 |
| Прочность студня с массовой долей сухого агара 0,85 %, г, не менее | 200 - 300 |
| Температура плавления студня с массовой долей сухого агара 0,85 %, °С, не ниже | 80 |
| Массовая доля влаги, %, не более | 18 |
| Массовая доля золы (в пересчете на сухое вещество), %, не более | 4,5 |
| Наличие йода и тяжелых металлов | Не допускается |
| Массовая доля общего азота (в пересчете на сухое вещество), %, не более | 0,2 |

4 Питательный бульон для культивирования микроорганизмов сухой – порошок светло - жёлтого цвета рН=7,2±0,2. Препарат гигроскопичен. Приготовление: 15 г препарата растворяется в 1 л дистилированной воды. Состав (г/л): панкреатического гидролизата кальция – 10,05; хлорида натрия – 4,95.

5 Вода дистиллированная. Предназначена для аналитических целей Н2О (ГОСТ 6709-73). Молекулярная вес 18. Концентрация водородных ионов в пределе 5,4-6,6. Сухой остаток не более 5 мг/л, после прокаливания не более 1мг/л.

6 Хлорид калия КСl, мол. масса 58,46 (ГОСТ 13380-68), добывают из недр открытым или подземным способом, получают из рапы озер или лиманов после естественного испарения воды, из морских вод сгущением растворов в специальных садочных бассейнах и выравниванием естественных рассолов на солевых заводах. Хлорид калия технический получают из отходов производства хлорида натрия. Эта соль содержит примеси хлорида магния и сульфата кальция. Применяется для приготовления синтетической среды.

7 Хлорид кальция технический (ГОСТ 450-77) получают в обезвоженном виде - CaCl2, плавленном виде – СаСl × 2Н2О, в жидком виде. Применяют для приготовления синтетической среды.

8 Фосфат аммония (NH4)3РO4, мол. масса 132,14 (ГОСТ 9097-74), - кристаллы белого или слабо-желтого цвета. Фосфат аммония технический (ТУ 6-03-395-75) получают из раствора фосфата аммония, являющегося отходом производства жидкого ангидрида.

Кроме того, использовались различные органические и неорганические кислоты и соли для определения культуральных свойств микроорганизмов и приготовления питательных сред.

**2.2 Методы исследования**

**2.2.1 Методика приготовления питательных сред для культивирования микроорганизмов**

Мясопептонный агар (МПА)

При культивировании микроорганизмов большое значение имеет обеспечение их соответствующим питанием. Белковой основой для всех сред является питательный бульон. Основой для приготовления мясопептонного бульона (МПБ) является мясная вода. Ее готовят следующим образом: 15 г сухого бульона растворяют в 1 дм3 дистиллированной воды и кипятят 1-3 мин. Для приготовления плотной питательной среды МПА к 1 дм3 МПБ добавляют 2-2,5% агар-агара от объема среды и расплавляют в автоклаве.

Синтетическая среда Рана

В 1 дм3 дистиллированной воды растворяют соли следующего состава (г/дм3): К2HPO4-5,0; (NH4)3РO4-5,0; KCl-следы; СаCl2-1,0; MgSO4 Х 7H2O-1,0; FeCl3 Х 7H2O-следы. В качестве источника углерода используют нерпичий жир в количестве 1 г/дм3. Для приготовления плотной синтетической среды добавляют агар-агар в количестве 2-2,5% от объема жидкой среды и расплавляют в автоклаве при давлении 1атм.

**2.2.2 Выделение чистой культуры методом разведений**

Разведения делают в стерильной водопроводной воде. Готовят определенный объем этого раствора и стерилизуют при 1 атм. В ходе одного опыта пользуются постоянным коэффициентом разведения, т.к. в этом случае уменьшается вероятность ошибки. Чаще всего делают десятичные разведения. Для этого берут пробирку с 10 см3 стерильного раствора и переносят стерильной пипеткой 1 см3 исследуемого материала в данную пробирку. Суспензию этого разведения тщательно перемешивают с помощью новой стерильной пипетки, вбирая в пипетку и выпуская из нее полученную смесь несколько раз. Это обеспечивает перемешивание суспензии и уменьшает адсорбцию клеток на стенках пипетки. Затем этой же пипеткой берут 1 см3 полученного разведения и переносят его во вторую пробирку. Таким образом, готовят и последующие разведения. Степень разведения определяется предполагаемым количеством микроорганизмов в образце и соответственно число разведений тем больше, чем больше микроорганизмов в исходном субстрате.

Для приготовления каждого разведения обязательно используют отдельную пипетку. Пренебрежение этим правилом может привести к получению ошибочного результата. Ошибка связана с адсорбцией микроорганизмов на стенках пипетки, в результате чего не все клетки удаляются из пипетки при приготовлении соответствующего разведения. Часть клеток, оставшаяся на стенках пипетки, может затем попасть в одно из последующих разведений, что и явится причиной получения завышенного результата.

#### 2.2.3 Посев на агаризованные среды в чашки Петри

В стерильные чашки Петри наливают расплавленную на кипящей водяной бане агаризованную среду, по 20-30 см3 в каждую. Чашки оставляют на горизонтальной поверхности, пока не остынет агар. Для посева отбирают чашки, среда в которых осталась стерильной. Когда используют элективные среды или выделяют и учитывают микроорганизмы, требующие повышенной влажности, посев проводят сразу же или вскоре после застывания агара.

Посев делают из определенных разведений в зависимости от предполагаемого количества микроорганизмов в исследуемом субстрате. Стерильной пипеткой наносят определенный объем (обычно 0,05; 0,1 или 0,2 см3) соответствующего разведения, предварительно тщательно перемешанного, на поверхность агаровой пластинки в чашки Петри. Этот объем распределяют по поверхности среды стерильным шпателем. Затем этим же шпателем проводят по всей поверхности во второй чашке, куда посевной материале вносили. При выявлении микроорганизмов, количество которых в субстрате относительно не велико, посевной материал распределяют по поверхности среды только в одной чашке.

Из каждого исследуемого разведения делают таким образом 2 - 3 параллельных высева. Для параллельных высевов из одного разведения можно пользоваться одной пипеткой и одним шпателем. Для посевов из разных разведений используют другую стерильную пипетку и другой шпатель. Чашки с засеянными средами помещают в термостат, отрегулированный на определенную температуру, благоприятную для развития выявляемых микроорганизмов.

Подсчет выросших колоний проводят через определенное время после посева, которое зависит от скорости роста выявляемых микроорганизмов на используемой в опыте среде и данной температуре.

Подсчитывают количество колоний, выросших при высеве из определенного разведения на двух (одной) чашки Петри. Результаты параллельных высевов суммируют и определяют среднее число колоний, выросших при высеве из этого разведения. Колонии считают, как правило, не открывая чашки. Для удобства отмечают просчитанную колонию точкой на наружной стороне дна чашки, пользуясь стеклографом или чернилами по стеклу. При большом количестве колоний дно чашки делят на секторы, подсчитывают количество колоний в каждом секторе и результаты суммируют или используют полуавтоматические счетчики.

**2.2.4 Изучение морфологии бактерий**

Морфологические свойства изучают путем микроскопирования окрашенных мазков, приготовленных из исследуемой колонии. При этом отмечаются формы микробных клеток, характер их расположения, наличие спор, капсул, жгутиков тинкториальная способность (окрашивание по методу Грама), определяют чистоту культуры. Кроме просмотра окрашенных мазков, устанавливают наличие жгутиков путем исследования культур на подвижность в препаратах «висячая» или «раздавленная» капля, а также путем посева культуры на полужидкий мясопептонный агар (подвижные бактерии вызывают помутнение агара, а неподвижные растут по уколу).

Из колоний готовят мазки, затем окрашивают по Грамму, Трухильо, проводят окраску жгутиков по Леффлеру.

Техника окраски по Граму заключается в следующем:

- На обезжиренном стекле делают мазки микроорганизмов. Мазки высушивают на воздухе и фиксируют под пламенем горелки;

- Мазки окрашивают в течение 1 мин генцианвиолетом;

- Препарат промывают в слабой струе водопроводной воды в течение 2 с.;

- Окрашивают препарат раствором Люголя в течение 1 мин.;

- Промывают препарат слабой струей водопроводной воды;

- Погружают препарат на 30 секунд в 96 %-ный спирт, взбалтывая последний, после чего препарат подсушивают промокательной бумагой;

- Окрашивают мазки раствором фуксина Пфейффера в течение 30 с.;

- Промывают препарат в слабой струе водопроводной воды до исчезновения окраски в стоке, подсушивают промокательной бумагой и микроскопируют.

#### Грамположительные бактерии окрашиваются в синий или фиолетовый цвет, а грамотрицательные - в красный.

Окраска по Трухильо заключается в следующем:

- Мазок фиксируют жаром;

- Наносят водный раствор малахитовой зелени (2 %) и в течение 3 мин подогревают на спиртовке до отхождения влаги;

- Промывают водой;

- Опускают на 1 мин в 0,25 % - ный водный раствор основного фуксина;

- Промывают водой;

- Высушивают фильтровальной бумагой и микроскопируют.

При таком методе окраски споры окрашиваются в зеленый цвет.

Окраска жгутиков по Леффлеру:

- Мазок заливают на 15-20 минут протравой Леффлера, необходимо следить, чтобы протрава не подсыхала;

- Препарат промывают дистиллированной водой;

- Окрашивают карболовым фуксином Циля в течении 3 минут;

- Высушивают фильтровальной бумагой и микроскопируют.

Клетки и жгутики окрашиваются в красный цвет.

**2.2.5 Методика изучения культуральных свойств**

Культуральные свойства определяют по характеру роста микробной культуры на плотной и жидкой питательных средах. Характер роста на плотной питательной среде изучают с подробным описанием формы, величины, цвета, поверхности, консистенции, краев и структуры колоний, образованных на синтетической питательной среде.

Микроскопическое изучение колоний проводят под микроскопом. Рассматривая колонии в проходящем свете невооруженным взглядом, описывают следующее: форму колоний; диаметр колоний; цвет, который обуславливается пигментом; рельеф колоний; поверхность; ее блеск, прозрачность; характер краев колоний; структуру колоний, ее консистенцию.

Для определения отношения микроорганизмов к кислороду делают посев уколом на мясопептонный агар (МПА). Посев уколом проводят бактериологической иглой путем прокалывания столбика агара в средней части, следя за тем, чтобы игла нигде не подходила к стенкам пробирки. Не доводя на сантиметр до дна пробирки иглу извлекают и обжигают над пламенем спиртовки.

**2.2.6 Метод раздавленной капли**

Применяется при исследовании морфологии и подвижности микроорганизмов.

Каплю микробной суспензии помещают на поверхность чистого обезжиренного предметного стекла. При работе с культурой, выросшей на твердой среде, на предметное стекло наносят каплю водопроводной воды, затем стерильной пипеткой берут небольшое количество культуры и перемешивают ее в капле. Покрывное стекло помещают ребром на предметное и осторожно помещают его на суспензию, следя за тем, чтобы между стеклами не было пузырьков воздуха. Избыток жидкости удаляют полоской фильтровальной бумаги.

**2.2.7 Определение липолитической активности**

Липолитические свойства культуры исследуют на среде определённого состава (бульон Штерна). Готовят бульон следующим образом: к 100 см3 МПБ добавляют 1 см3 глицерина и приливают 2см3 свежеприготовленного 10 %-ного водного раствора сульфита натрия, затем по каплям 10 %-й спиртовой раствор основного фуксина (≈ 5 кап.).

Культуры культивируют в термостате при 37 0С. Отмечают изменение цвета среды, рН (лакмусовой бумагой), помутнение, наличие хлопков.

**2.2.8 Приготовление бактериальной суспензии**

Стерильную жидкую синтетическую среду разливают в стерилизованные конические колбы по 100 см3.

Для получения биомассы исследуемой культуры микроорганизмов, делают посев на скошенный агар.

Подготовленные таким образом культуры инкубируют в термостате 24 ч при температуре (37±5)°С, по окончании чего в пробирки с микроорганизмами вводят 5 см3 соответствующей жидкой синтетической среды, осуществляя процесс механического воздействия. Приготовленную таким образом бактериальную суспензию вносят в колбы, содержащие по 100 см3 соответствующей жидкой синтетической среды.

Культивирование микроорганизмов проводят в термостате при температуре 38±5°С, с переменным механическим воздействием, осуществляемом на Shaker Type, с частотой колебаний 200 об/мин, амплитудой 6 по 1 ч в сутки.

**2.2.9 Определение общего количества микроорганизмов (КОЕ)**

Сущность метода заключается в определении в 1 см3 воды общего содержания мезофильных аэробов и факультативных анаэробов при культивировании на синтетической питательной среде при температуре 40 °С в течении 24 часов. Определение начинают с приготовления разведений. Для этого в несколько пробирок наливают 10 см3 стерильной воды. В первую пробирку стерильной пипеткой добавляют 1 см3 исследуемой воды. Новой стерильной пипеткой вносят пробу в пробирку со стерильной водой, после чего этой же пипеткой набирают 1 см3 из приготовленного разведения и переносят во вторую, из второй в третью и т. д. Из каждой пробы делают посев не менее двух различных объемов, выбранных с таким расчетом, чтобы на чашках выросло от 30 до 300 колоний. По истечении 24 часов при температуре 40 °С подсчитывают число выросших колоний. Если выросло большое количество колоний, то дно чашки делят на секторы и подсчет ведут в каждом отдельном секторе. Результаты подсчета выражают в количестве бактерий на 1 см3 анализируемой воды с учетом посеянного объема.

**2.2.10 Определение мутности**

Мутность определяют фотометрическим методом при длине волны 540 нм и толщине поглощаемого слоя 30 мм. Определение мутности проводят до процесса высаливания. При этом исходный раствор отфильтровывают от жира. Стандартным раствором является дистиллированная вода.

**2.2.11 Определение кислотности**

10 см3 исследуемой жидкости вносят в коническую колбу емкостью 100-250 см3 и титруют 0,1 н раствором едкого натра в присутствии индикатора фенолфталеина до слабо-розовой окраски.

Реакция протекает по схеме:

СН3СООН + NаОН = СН3СООNа + Н2О

Содержание органической кислоты (К), г/дм3 определяют по формуле (1):

а × к ×0,006 ×1000

К = = а × к ×0,6 , (1)

10

где К – содержание кислоты, г/дм3;

а – количество 0,1 н раствора щелочи, израсходованной на титрование, см3;

к – поправка к титру едкого натра;

0,006 – количество уксусной кислоты, соответствующей 1 см3 0,1 н раствора гидроксида натрия.

**2.2.12 Определение активной реакции среды**

Активная реакция среды, т.е. степень ее кислотности или щелочности, характеризуется качественно концентрацией водородных ионов. Концентрацию ионов водорода выражают величиной рН.

Величину рН определяют потенциометрическим методом при помощи потенциометра со стеклянными электродами.

Перед началом измерений прибор включают в сеть при помощи тумблера и дают нагреваться в течение 20 минут.

Электроды перед погружением в раствор тщательно промывают дистиллированной водой и просушивают фильтровальной бумагой .

Вначале измерение проводят по шкале от 0 до 14 (грубое определение), а затем переключают прибор на более узкий интервал.

Перед измерением рН сточную воду хорошо перемешивают и измеряют температуру для введения необходимых поправок.

**2.2.13 Биуретовый метод определения белка по Ярош**

Метод используется в растворах белков с концентрацией от 0,04 до 1,6 мг/см3.

Необходимые реактивы. Биуретовый реактив – в мерную колбу на 1 дм3 наливают 400 см3 0,2н раствора NaOH, добавляют 9г калия-натрия виннокислого, перемешивают до полного растворения, добавляют 3г сульфата меди (порошка) и 5г йодистого калия, объем доводят до метки 0,2н раствором NaOH; раствор мочевины – к 300г мочевины (карбамида) прибавляют кусочек тимола величиной с горошину, приливают 700 см3 дистиллированной воды и смесь нагревают, затем прибавляют 3г активного угля, перемешивают фильтруют в мерную колбу на 1 дм3, объем доводят до метки дистиллированной водой.

Техника определения. В пробирку наливают 2,4см3 раствора мочевины, 0,1см3 раствора белка и 2,5см3 биуретового реактива. Смесь хорошо перемешивают и пробирки помещают в водяную баню при температуре 40оС на 10 минут. Затем их охлаждают до 20оС. Через 30 минут после добавления биуретового реактива раствор колориметрируют на ФЭК при длине волны 540нм. Количество белка находят по калибровочной кривой, составленной по яичному альбумину.

Для построения калибровочной кривой готовят исходные водные растворы с содержанием 10, 20, 30, 40, 50, 60 мг белка в 10см3. Из полученных растворов отбирают в пробирки по 0,1см3, добавляют 2,4см3 раствора мочевины и 2,5см3 биуретового раствора и ведут определение описанным выше методом. Калибровочный график представлен на рисунке 3



Рисунок 3 – Калибровочный график зависимости оптической плотности от содержания белка

**2.2.14 Метод определения протеолитической активности (ПС) Вильштеттера и Вальдшмидт-Лейтца в модификации**

Метод основан на определении свободных карбоксильных групп в спиртовых растворах аминокислот и полипептидов.

Активность (ПС) выражают количеством миллиграммов аминного азота, которое образуется при гидролизе определенного количества 5%-ного раствора желатина с рН 7,3-7,5 1г препарата или 1см3 ферментного раствора за 1 час при температуре 40оС.

За единицу протеолитической активности принимают количество фермента, которое образует 1мг аминного азота за 1 час в принятых условиях опыта.

Необходимые реактивы. Фосфатный буферный раствор с рН 7,3-7,5; 5%-ный раствор желатина, приготовленный на основе буферного раствора, перед употреблением раствор желатина нагревают на водяной бане до 40оС; 1%-ный спиртовой раствор тимолфталеина; 0,1н раствор гидроксида натрия; 96%-ный этиловый спирт.

Техника определения. К 10см3 5%-ного раствора желатина с рН 7,3-7,5 приливают 2см3 испытуемого ферментного раствора и сразу же отбирают 1см3 реакционной смеси в коническую колбу на 50-100см3, куда предварительно налито 20см3 96%-ного этилового спирта и 0,2см3 1%-ного раствора тимолфталеина. Пробу тут же титруют 0,1н раствором гидроксида натрия. После появления голубой окраски в растворе прибавляют еще 4 капли щелочи и на этом титрование заканчивают. Титрование проводят из микробюретки с ценой деления 0,02см3.

Оставшуюся смесь желатина с ферментным раствором помещают в термостат с температурой 40оС для гидролиза. Через 3 часа 1см3 реакционной смеси отбирают во вторую коническую колбочку на 50-100см3, куда предварительно налито 20см3 96%-ного этилового спирта и 0,2см3 1%-ного раствора тимолфталеина и титруют аналогично контролю.

Расчет протеолитической активности ПС ведут по формуле (2):

ПС = , (2)



где ПС – протеолитичсекая активность, ед/г;

*А* – количество аминного азота, накопленное за время опыта в реакционной смеси, мг;

*t* – время протеолиза, ч;

*Р* – коэффициент, учитывающий разведение и пересчет на 1г препарата или 1см3 жидкого ферментного раствора.

Величина *А* рассчитывается по формуле (3):

А=(а-ак)×1,4×К, (3)

где A – количество аминного азота, мг;

а – количество 0,1н раствора NaOH, пошедшее на титрование 1см3 опытной пробы, см3;

ак – то же, для контрольной пробы;

1,4 – коэффициент пересчета количества 0,1н раствора щелочи в миллиграммы азота аминокислот и полипептидов;

К – поправка к титру щелочи.

**2.2.15 Определение активности липазы (ЛС) (модифицированный метод Ота, Ямада)**

За единицу ферментативной активности липазы принимают такое количество фермента, которое освобождает 21мкмоль олеиновой кислоты из 40%-ной эмульсии оливкового масла при рН 7,0 и температуре 37оС в течении 1часа.

Метод основан на определении путем титрования щелочью жирных кислот, образовавшихся под действием липазы при использовании в качестве субстрата оливкового масла.

Необходимые реактивы. Раствор оливкового масла (субстрат); 2%-ный раствор поливинилового спирта; 1н раствор соляной кислоты (HCl); 0,05н раствор гидроксида натрия (NaOH); фосфатно-цитратный буфер с рН 7,0; 1%-ный раствор фенолфталеина; 90%-ный раствор спирта; 1%-ный раствор фермента.

Техника определения. 5см3 эмульсии субстрата и 4см3 буфера с рН 7,0 помещают в колбу Эрленмейера на 100см3, которую закрывают пробкой. Смесь выдерживают на водяной бане при температуре 37оС в течении 10 минут. Затем к смеси добавляют 1см3 раствора фермента и хорошо перемешивают. Полученную смесь выдерживают при температуре 37оС в течении 1 часа, после чего немедленно добавляют 30см3 этанола для прекращения реакции. Раствор титруют 0,05н раствором NaOH в присутствии 1%-ного раствора фенолфталеина до исчезновения окраски.

Контрольную пробу готовя следующим образом. К смеси субстрата и буфера с рН 7,0, выдержанной при температуре 37оС, добавляют 30см3 этанола, затем 1см3 ферментного раствора и смесь немедленно титруют.

Разность между результатами титрований контрольной и опытной проб соответствует количеству 0,05н раствора NaOH, которое пошло на нейтрализацию жирных кислот, образовавшихся из оливкового масла под действием фермента.

Липазную активность фермента ЛС (в ед/г) определяют по формуле (4):

ЛС=, (4)



где ЛС – липолитическая активность, ед/г;

*А* – разность между результатами титрований опытной и контрольной проб, см3;

*Т* – титр щелочи;

*В* – концентрация образца ферментного раствора, г/см3.

**2.2.16 Определение концентрации взвешенных веществ**

Предварительно готовят фильтры следующим образом: промывают горячей водой (дистиллированной), затем высушивают до постоянного веса в сушильном шкафу при температуре 105оС.

Для определения содержания взвешенных веществ их отделяют, фильтруя сточную воду, объемом 50-100 см3 через бумажный фильтр средней плотности, доведенный до постоянного веса. Оставшийся на стенках стакана осадок смывают небольшой порцией фильтрата и переносят на фильтр. Осадок смывают небольшим количеством (10-15 см3) спиртоэфирной смеси для удаления веществ, сорбированных на поверхности взвешенных веществ. Фильтр с осадком помещают в тот же бюкс, в котором его взвешивали до фильтрования, и высушивают в сушильном шарфу при температуре 105оС в течение 2 часов. Бюкс закрывают крышкой и охлаждают в эксикаторе над прокаленным хлоридом кальция. Затем взвешивают с абсолютной погрешностью не более 0,0002 г.

Высушивание, охлаждение, взвешивание повторяют до достижения постоянной массы.

Содержание взвешенных веществ определяют по формуле (5):

# Х = **,** (5)



где Х – содержание взвешенных веществ;

*m1* – масса бюкса с высушенным фильтром и осадком, г;

*m2* – масса бюкса с высушенным фильтром, г;

*V* – объем воды, взятой для фильтрования, см3.

**2.2.17 Определение содержания органических веществ**

Для определения химического потребления кислорода (ХПК) берут 1-5 см3 профильтрованной воды, прибавляют 2,5 см3 0,25н раствора дихромата калия, 0,4 г сульфата ртути (II), 0,2-0,4 см3 сульфата серебра и при перемешивании приливают концентрированную серную кислоту (7,5 см3 на 1 см3 пробы, 15 см3 на 5 см3 пробы). При этом температура раствора поднимается до 100оС. Через 2 минуты раствор охлаждают до комнатной температуры, приливают 100 см3 дистиллированной воды и титруют избыток дихромата калия 0,25н раствором соли Мора в присутствии 10-15 капель N-фенилантраниновой кислоты или 3-4 капель ферроина. Изменение окраски в первом случае от красной до изумрудно-зеленой, во втором – от голубовато-зеленой до красно-голубой.

Параллельно проводят контрольный опыт без сточной воды.

ХПК выражают в миллиграммах кислорода на 1 дм3 воды (мгО/дм3).

Расчет производят по формуле (6):

(V1-V2)×k×0.25×8×1000

ХПК = , (6)

V

где ХПК – химическое потребление кислорода, мг О2/дм3;

V1,V2 – объемы 0,25н раствора соли Мора, израсходованные на титрование в контрольном опыте и пробы сточной воды, см3;

k – поправочный коэффициент для приведения концентрации раствора соли Мора к точно 0,25н;

0,25 – концентрация раствора соли Мора;

8 – эквивалент кислорода;

V – объем сточной воды, взятой на определение, см3.

**2.2.18 Отбор проб методом асимметрической бахромы**

Для сопоставимости результатов исследований различных факторов или технологических параметров необходимо исключить влияние топографии шкуры, полуфабриката или кожи. В этом случае для отбора средней пробы пользуются методом асимметрической бахромы (МАБ), который заключается в следующем. Намечают необходимое число вариантов исследования и задаются числом образцов (полосок), входящих в группу, предназначаемую для каждого варианта (обычно не менее 4). Чем больше число образцов, тем более достоверным будет среднее значение, характеризующее вариант. Размер образца предопределяется набором физико-механических или физических испытаний, которые предполагается провести, а все образцы должны уложиться в прямоугольник, вписанный в чепрачную часть, показанный на рисунке 3

|  |  |
| --- | --- |
| 5 | 1 |
| 4 | 2 |
| 3 | 3 |
| 2 | 4 |
| 1 | 5 |
| 5 | 1 |
| 4 | 2 |
| 3 | 3 |
| 2 | 4 |
| 1 | 5 |

# Рисунок 3 - Схема отбора проб методом асимметрической бахромы

**2.2.19 Определение колористических показателей волосяного покрова**

Колористические показатели волосяного покрова определяются на приборе «Пульсар». Образцы тщательно расчесываются, накрывают стеклом и фотографируют. Далее работают при установлении кнопки «режим» - 3.

Предварительно прибор прогревают в течение 30 минут, затем нажатием кнопки «сброс» очищают панели вывода.

Первоначально производят калибровку прибора, для этого устанавливают «режим» - 0 (калибровка прибора); «вывод» - 0. Белую пластину помещают на место отражающего образца; черную – на место измеряемого образца, нажимают «пуск », после загорания «Б» извлекают черную пластину. Снова нажимают «пуск», загорается «I» извлекают белую пластину. Устанавливают на индикаторе «режим» - 1; «вывод» - 0 (измерение прозрачных проб) на место прозрачного образца – дистиллированную воду, нажимают пуск.

Для измерения рабочего образца устанавливают пробу. Нажимают «пуск», снимают показания индикатора в соответствии литературными данными.

**2.2.20 Определение содержания несвязанных жировых веществ (ГОСТ 26129-84 Шкурки меховые и овчина шубная выделанные. Методы определения несвязанных жировых веществ)**

Навеску измельченной кожевой ткани или волоса массой 0,5-0,6 г взвешенною с погрешностью не более 0,0002 г, помещают в бумажную гильзу и закрывают тампоном. Гильзу закрепляют в предварительно доведенной до постоянной массы колбе и соединяют колбу с обратным холодильником. В колбу заливают 50 см3 хлороформа или дихлорэтана. Колбу с растворителем нагревают на электрической плитке с асбестовым покрытием. Продолжительность экстрагирования при анализе кожевой ткани - 45 минут, при анализе волоса – 15-20 минут. Растворитель должен постоянно кипеть и, охлаждаясь и стекая с холодильника, попадать в центр гильзы. В дальнейшем растворитель отгоняют и колбу с жировыми веществами доводят до постоянной массы в сушильном шкафу при температуре 128-130˚С. Продолжительность первой сушки 30 минут, последующих – по 15 минут.

Массовую долю жировых веществ вычисляют по формуле (8):

*Х1* = ×100, (8)



где *Х1* – массовая доля жировых веществ;

*m* – масса колбы с экстрагированными веществами, г;

*m1* – масса пустой колбы, г;

*m2* – масса навески кожевой ткани или волоса, г.

**3 Экспериментальная часть**

В настоящее время проблема загрязнения водного бассейна антропогенными сбросами во всем мире стоит на первом месте. Для региона республики Бурятия эта проблема является наиболее важной, так как на нашей территории находится мировое наследие – озеро Байкал. Характер стоков, поступающих в водный бассейн достаточно разнообразен, так как на территории республики находится довольно много средних и мелких предприятий по переработке пушно-мехового сырья, по производству мясной и молочной продукции, немаловажное значение имеет загрязнение бытовыми стоками. К основным загрязнителям стоков пушно-меховых предприятий относятся соли хрома (III) и (VI), красители, ПАВ, а также жировые вещества, которые образуются при проведении процессов отмоки и обезжиривания. При очистке сточных вод, содержащих жировые вещества, на первом этапе применяют физические и физико-химические методы очистки, наиболее распространенным из которых является метод флотации, на последующих этапах очистки большое распространение получили биологические методы, основанные на применении микроорганизмов-деструкторов жировых веществ. Известно, что деструкция жира на первом этапе происходит до глицерина и карбоновых кислот (основных составляющих в структуре жиров), интерес представляют последующие продукты деструкции. В связи с этим, целью дипломной работы являлось изучение морфолого-культуральных свойств микроорганизмов, выделенных из жировых материалов и из сточных вод после процесса обезжиривания, и исследование деструкции жировых веществ прокариотическими микроорганизмами.

**3.1 Восстановление и исследование морфолого-культуральных свойств микроорганизмов, деструктирующих жировые вещества**

С целью восстановления свойств микроорганизмов в жидкие питательные среды объемом 150 см3 на основе мясопептонного бульона (МПБ) и синтетической среды Рана, в которой в качестве источника углерода служил нерпичий жир (п.2.2.1), внесли исследуемые культуры в количестве 105 кл/ см3 (петлей). Культивирование проводили в колбах Эрленмейера объемом 250 см3 в термостате марки «ТС-80М-2» при температуре (37±0,5)˚С в течение 24 часов в состоянии покоя. После истечения заданного времени культивирования перенесли 0,1 мл. бактериальной суспензии и произвели посев на соответствующие плотные среды в чашки Петри.

Для исследования морфолого-культуральных свойств прокариотических организмов была восстановлена культура микроорганизмов методом штриха и разведений (п.п.2.2.2-2.2.3) на мясопептонном агаре (МПА) и на синтетической среде Рана. Культивирование проводили в перевернутых чашках Петри в термостате при температуре (37±0,5)˚С в течение 24 часов для МПА и 48 часов для среды Рана.

Выделенные культуры были обозначены следующим образом: Нв – микроорганизмы, выделенные из жира нерпы, но адаптированные к росту на шерстном жире; Н – микроорганизмы, выделенные из жира нерпы; В – выделенные из шерстного жира; 3, 8 – культуры микроорганизмов, выделенные из сточных вод после проведения процесса обезжиривания меховой овчины.

При рассмотрении характера роста культур на разных средах можно отметить, что колонии микроорганизмов, выращенных на мясопептонном агаре, характеризуются более значительными размерами, по сравнению с культурами, выращенными на синтетической среде Рана, что обусловлено повышенной чувствительностью культур к агрессивной среде, содержащей в качестве единственного источника углерода нерпичий жир, в количестве 1 г/дм3.

Исследование морфолого-культуральных свойств, выделенных колоний микроорганизмов проводили по следующим параметрам: окрашиванию по методам Грама, Трухильо и Леффлеру (п.2.2.4), определение подвижности методом раздавленной капли (п.2.2.6) и определение культуральных свойств (п. 2.2.5).

Результаты исследования морфолого-культуральных свойств бактерий представлены в таблице 3 и на рисунках А1-А5.

Таблица 3 – Сравнительная таблица морфолого-культуральных признаков исследуемых культур

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Признак | Тип культуры | | | | | | |
| Н | | Нв | | В | 3 | 8 |
| Место выделения | Природные жиры: шерстный, нерпичий. | | | | | Сточные воды после проведения процесса обезжиривания | |
| Морфология | Коккобактерии | | | | | Палочки, сцепленные попарно и более | |
| Рельеф колоний | Плоские | | | | | | |
| Прозрачность | Непрозрачная | | | | | | |
| Края колонии | Ровные | | | | | | |
| Структура колонии | Гомогенная | | | | | | |
| Консистенция | Мазеобразная | | | | | | |
| Окраска по Граму | + | + | | + | | + | + |
| Окраска по Трухильо | - | - | | - | | - |  |
| Окраска по Леффлеру | + | + | | + | | + | + |
| Подвижность | + | + | | + | | + | + |
| Расположение жгутиков | Перетрихи | | | | | | |
| рН (опт) | 5,6-7,5 | | | | | | |
| Температура (опт), оС | 25-40 | | | | | | |
| Форма колоний | Точечная | | | | | | |

Окрашивание мазков показало, что все культуры являются грамположительными мелкими палочками, аспорогенными с перетрихиальным расположением жгутиков. Более подробно форму бактерий можно рассмотреть на рисунках 2-6, полученных в результате фотографирования окрашенных мазков на микроскопе Ломо Микмед–1 с помощью цифрового фотоаппарата «Samsung». По форме бактерий культуры типа Н, Нв и В следует отнести к коккобактериям – мелким палочкам, близким к овальной форме, в то время как культуры типа 8, 3 представляют собой бактерии, диплобактерии и стрептобактерии. Размер исследуемых микроорганизмов варьируется в пределах 0,1-0,5 нм.

При рассмотрении раздавленной капли бактериальной суспензии было отмечено броуновское движение бактерий, сопровождающееся вращательным движением, обусловленным перетрихиальным расположением жгутиков.

Результаты изучения культуральных свойств представлены на рисунках А6-А10. При изучении культуральных свойств установлено, что все культуры имеют точечные колонии матового цвета, непрозрачные, с ровными краями.

Для определения липолитической активности был произведен посев в бульон Штерна, содержащего в качестве субстрата глицерин. Посев производили следующим образом: для получения биомассы исследуемой культуры микроорганизмов производили посев на скошенную синтетическую среду и культивировали в течение 24 часов при температуре (37±0,5)˚С, затем произвели смыв полученной биомассы 10 см3 бульона Штерна в пробирки, и термостатировали при температуре (37±0,5)˚С в течение 120 часов в термостате марки «ТС-80М-2».

При рассмотрении поведения культур в данной среде выявлено, что уже к 24-48 часам культивирования имело место переход окраски бульона из розового в ярко – красный (рисунок А11), образование хлопьевидного осадка и газообразование. К 72 часам культивирования наблюдалось появление биопленки и пристеночного кольца, а к 96 часам посветление сред до светло-розового цвета. При рассмотрении окраски по столбу жидкости была отмечена ее дифференсация: окраска была более интенсивной в верхней части жидкости, что возможно обусловлено более высоким содержанием кислорода в этом слое. Следовательно, для роста данных микроорганизмов необходим кислород.

Также было отмечено изменение активной реакции среды (рН=7 контрольной пробы). Через 24 часа культивирования после заражения бульона Штерна при температуре (37±0,5)˚С произошло понижение рН с 5 до 3 для всех исследуемых сред за исключением сред, содержащих культуру 8, активная реакция которой сохранялась в течение 72 часов и составляла рН=4, а к 120 часам культивирования повысилась до рН=5. Для остальных культур было характерно плавное повышение активной реакции среды до рН=5 к окончанию культивирования (120 часов).

На основе проведенных исследований следует отметить, что исследуемые культуры микроорганизмов обладают липолитической активностью, т.е. вовлекают вещества жировой природы (в качестве источника углерода) в конструктивный и энергетический обмен, что заметно по таким показателям среды как: появление хлопьевидного осадка, изменение цвета от восстановления индикатора при изменении рН. Однако выявления культуры с чётко выраженной максимальной величиной активности по липазе не было – наблюдается одинаково равнозначные характеристики роста на специализированной среде в течение всего периода культивирования.

**3.2 Изучение толерантности исследуемых культур к факторам внешней среды**

Для исследования влияния внешних факторов на динамику роста и развития микроорганизмов, а также для культур, продуцирующих суммарный продукт жизнедеятельности микроорганизмов с максимальной липолитической и минимальной протеолитической активностью провели скриннинговое исследование.

Для этого культивирование проводили в колбах Эрленмейера объемом 250 см3, содержащей 200 мл бактериальной суспензии на основе жидкой синтетической среды Рана (п.2.2.8). Количество вводимой биомассы 105 кл/см3 на 200 см3 рабочей жидкости. Культивирование микроорганизмов проводили в термостате при температуре (37±5)°С, осуществляя переменное механическое воздействие на встряхивателе «Shaker Type-357», с частотой колебаний 200 об/мин, амплитудой 6 по 2 ч в сутки в течение 48 часов. Для изучения динамики активности микроорганизмов через каждые 24 часа снимали такие показания, как подсчет величины КОЕ (п.2.2.9), мутность (п.2.2.10), кислотность (п.2.2.11), активная реакция среды (п.2.2.16) после 48 часов культивирования был определен суммарный продукт жизнедеятельности микроорганизмов (п.2.2.12). Кроме того, определяли показатели для контрольной среды – не зараженной культурами микроорганизмов.

Для определения липолитической и протеолитической активностей эндофермента бактериальную суспензию после 48 часов культивирования подвергали центрифугированию при 5000 об./мин. в течение 15 минут. Осадок, образующийся в результате центрифугирования замораживали, после чего растирали в фарфоровой ступке со стеклом, добавив 100 см3 дистиллированной воды. Полученную суспензию центрифугировали при 5000 об./мин. 10 минут для удаления стекла. После того как, стекло удалили в полученную жидкость вводили 30% от объема (NH4)2SO4 для высаливания белка и центрифугировали при 5000 об./мин. в течение 15 минут, после чего на стенках центрифужной пробирки образовывался желтый налет, который собирали в колбу Эрленмейера объемом 100 см3 и приливали 30 см3 дистиллированной воды, тщательно перемешивали и и отбирали пробы для определения липолитических, протеолитических свойств (п.2.2.13, 2.2.14) и суммарного продукта жизнедеятельности микроорганизмов.

Для определения липолитических и протеолитических свойств экзофермента в над осадочную жидкость полученную после первого центрифугирования при определении свойств эндофермента вводили 30% от объема (NH4)2SO4 для высаливания белка, и проводили все операции аналогично как при определении активностей эндофермента.

Протеолитическую активность определяли по методу Вильштеттера и Вальдшмидта-Лейтца (п.2.2.13) и рассчитывали по формулам (2) и (3).

Пример расчета протеолитической активности для культуры Н:

а = 1,4 мл.; ак = 1,29 мл.

А = (1,4-1,29) × 1,4 × 1 = 0,154 мг.

0,154 × 12 × 100

ПС = = 3,08 ед. на 1 г. культуры.

3 × 1 × 2 × 10

Липолитическую активность определяли по модифицированному методу Ота, Ямада (п.2.2.14) и рассчитывали по формуле (4).

Пример расчета липолитической активности для культуры Н:

В = 46,3 г/см3; А = 0,25 см3.

0,25 × 2 × 50

ЛС = = 0,54 ед./г.

46,3

Дальнейшие расчеты проводили аналогичным образом. Результаты, полученные после проведения скриннинговых исследований, представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Результаты проведения скриннинговых исследований

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Показания | Тип культуры | | | | | | | | | | |
| Н | | Нв | | В | | 3 | | 8 | | Контр |
| 0ч | 48ч | 0ч | 48ч | 0ч | 48ч | 0ч | 48ч | 0ч | 48ч |
| рН | 7,25 | 7,40 | 7,28 | 7,44 | 7,30 | 7,40 | 7,33 | 7,40 | 7,37 | 7,10 | 7,31 |
| Кислотность, г/дм3 | 1,26 | 1,56 | 1,20 | 1,26 | 1,20 | 1,38 | 1,50 | 1,20 | 1,50 | 1,44 | 1,20 |
| Оптическая плотность D5402 | 7,00 | 8,10 | 6,20 | 5,60 | 5,80 | 5,60 | 6,60 | 4,60 | 4,00 | 5,80 | 5,60 |
| КОЕ, кл/см3 | 3,3×105 | 5,1×105 | 1,2×106 | 6,1×106 | 5,8×105 | 4,1×106 | 7,3×105 | 5,3×106 | 2,4×106 | 6,8×106 | - |
| Сум-ый продукт жизн-ти, гр./дм3 | 0,08 | | 0,05 | | 0,17 | | 0,04 | | 0,03 | | - |
| Протеолитическая активность экзофермента, ед./гр. | 3,08±0,12 | | 5,32±0,25 | | 8,26±0,23 | | 3,36±0,27 | | 5,60±0,32 | | - |
| Протеолитическая активность эндофермента, ед./гр. | 1,82±0,23 | | 3,64±0,19 | | 2,66±0,31 | | 5,60±0,24 | | 11,2±0,30 | | - |
| Липолитическая активность экзофермента, ед./гр. | 0,54±0,26 | | 1,16±0,23 | | 0,26±0,14 | | 1,79±0,12 | | 1,79±0,23 | | - |
| Липолитическая активность эндофермента, ед./гр. | 0,83±0,21 | | 2,15±0,17 | | 0,76±0,28 | | 2,87±0,26 | | 3,59±0,11 | | - |

Полученные результаты показывают, что для всех культур, за исключением культур 3 и 8, характерен рост кислотности к 48 часам культивирования, что связано с вовлечением жирового материала в конструктивный и энергетический обмен микроорганизмами. В результате метаболических процессов наблюдается деструкция жирового материала до глицерина и карбоновых кислот, в результате образования которых повышается кислотность среды. К примеру, кислотность среды, содержащей культуру Н возрастает с 1,26 г/дм3 до 1,56 г/дм3, что соответствует наиболее максимальному возрастанию кислотности по сравнению с остальными средами. Наименьшая интенсивность возрастания данного показателя отмечена для сред, содержащих культуру Нв - увеличение с 1,2 г/дм3 до 1,26 г/дм3.

Оптическая плотность определяли на фотоколориметре ФЭК-4 при длине волны 540 нм, чувствительности 2 и толщине поглощающего слоя 3,025 мм. При изучении динамики изменения значений мутности можно отметить, что для бактериальных суспензий культур Н и 8 характерен рост данного показателя в течение 48 часов культивирования, связанный с наступлением для культур микроорганизмов благоприятной для их бурного развития лог-фазы. Наибольшее увеличение значения мутности характерно для среды, содержащей культуру 8. К 48 часам культивирования наблюдался рост мутности с 4,0 до 5,8, что связано с интенсивным вовлечением природных жировых веществ в клеточный метаболизм. Уменьшение значения мутности наблюдалось у бактериальных суспензий культур Нв, В и 3. Данная динамика может объясняться процессами автолиза, в частности возрастанием лимитирования по субстрату и образованием альдегидов

Изменение рН рабочей жидкости проводили на цифровом иономере Анион 7000. Из данных таблицы видно, что уменьшение рН наблюдалось только для среды, содержащей культуру 8, что вероятно связано с деструкцией жира и образованием глицерина и карбоновых кислот, обуславливающих кислую реакцию среды.

О O

// //

СН2 – О – С R1 – C

\ \

R1 CH2 – OH OH

⎢ О ⎜ O

// CH – OH + //

СН – О – С → ⎜ R2 – C

\ CH2 – OH \

R2 OH

⎢ O O

// //

CH2 – O – C R3 – C

\ \

R3 OH

В течение 48 часов вероятно происходит расщепление карбоновых кислот микроорганизмами до соответствующих альдегидов, которые окисляются до кислот или полимеризуются. В результате чего значение рН через 48 часов увеличилось для сред, содержащих культуры Н, Нв, В и 3.

O O

// //

R – C → R – C

\ \

OH H

Также наблюдался устойчивый рост величины КОЕ в течение всего периода культивирования с 105 по 106 кл/см3, что указывает на достаточное количество субстрата в синтетической среде и его утилизации.

На основании проведения скриннинговых исследований можно отметить, что все исследуемые культуры осуществляют деструкцию жирового материала. Деструкция жирового материала на первом этапе возможно происходит до глицерина и карбоновых кислот, это подтверждается увеличением значений кислотности в первые часы культивирования. В результате проведения предварительного скрининга и изучения морфолого-культуральных признаков исследуемых прокариотических организмов были отобраны наиболее активные культуры для проведения дальнейших исследований. Интерес представляла культура 8, характеризующаяся максимальным ростом оптической плотности среды до 48 часов культивирования и культура Нв с наибольшим значением липолитической активности. Для выбранных культур провели скриннинговое исследование через 24ч и 48часов по которому сделали подбор оптимального времени культивирования. Результаты представлены в таблице 5 и на рисунках 4-6.

Таблица 5 – Подбор оптимального времени культивирования

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Показания | Тип культуры | | | | | |
| 8 | | | Нв | | |
| 0ч | 24ч | 48ч | 0ч | 24ч | 48ч |
| рН | 7,64 | 7,61 | 7,67 | 7,65 | 7,63 | 7,66 |
| Кислотность, г/дм3 | 1,30 | 1,40 | 1,70 | 1,40 | 1,60 | 1,50 |
| Оптическая плотность D5402 | 4,50 | 5,20 | 3,60 | 4,80 | 4,90 | 4,70 |
| КОЕ | 2,70×106 | 5,10×106 | 8,40×106 | 9,20×105 | 2,50×106 | 4,70×106 |
| Сум-ый продукт жизн-ти, г/дм3 | - | 0,05 | 0,03 | - | 0,03 | 0,01 |
| Протеолитическая активность, ед./гр. | - | 2,80±0,25 | 2,24±0,16 | - | 4,48±0,22 | 1,68±0,15 |
| Липолитическая активность, ед./гр. | - | 4, 53±0,21 | 1, 23±0,24 | - | 3, 47±0,18 | 1, 19±0,27 |

При анализе таблицы можно сделать вывод, что при достижении необходимого объема бактериальной суспензии значительных изменений в показаниях не происходило. Вероятно, это говорит о том, что система стабилизирована.



Рисунок 4 – Динамика изменения активной реакции среды для сред, содержащих культуры 8 и Нв



Рисунок 5 – Динамика изменения кислотности для сред, содержащих культуры 8 и Нв

Для показателя кислотности бактериальных суспензий характерно увеличение к 24 часам культивирования для сред, содержащих культуры Нв и 8, с дальнейшим уменьшением значения кислотности для среды, содержащей культуру Нв, обусловленное, возможно полным расщеплением субстрата, в качестве которого выступал нерпичий жир и расщепление образовавшихся карбоновых кислот до альдегидов, либо одноатомных спиртов. Для среды, содержащей культуру 8 наблюдалось увеличение кислотности до 48 часов культивирования, что связано с ее меньшей активностью.



Рисунок 6 – Динамика изменения оптической плотности для культур 8 и Нв

При рассмотрении динамики изменения оптической плотности можно отметить увеличение данного показателя для обеих культур, что связано с интенсивным вовлечением природных жировых веществ в клеточный метаболизм. А в дальнейшем, в связи с автолитическими процессами, наиболее важным из которых является лимитирование по субстрату, наступает так называемая фаза отмирания микроорганизмов, что влечет за собой уменьшение показаний мутности к 48 часам культивирования.



Рисунок 7 – Диаграмма зависимости протеолитической и липолитической активностей суммарного продукта жизнедеятельности микроорганизмов от продолжительности культивирования

При анализе протеолитической и липолитической активностей можно сделать вывод, что минимальной протеолитической активностью обладает суммарный продукт жизнедеятельности культуры Нв, а максимальной липолитической активностью обладает суммарный продукт жизнедеятельности культуры 8 через 24 часа культивирования. Следовательно, в подготовительных процессах выделки, а именно в обезжиривании будет использована культура 8.

**3.3 Проведение процесса обезжиривания меховой овчины с применением бактериальной суспензии**

Целью данного этапа эксперимента являлось изучение возможности применения микроорганизмов для проведения процесса обезжиривания меховой овчины. Основываясь на результаты скриннингового исследования, были выбраны оптимальное время культивирования (24 часа) и культура 8 в качестве продуцента суммарного продукта жизнедеятельности микроорганизмов.

Для проведения процесса обезжиривания по типовой методике необходимо наличие в рабочей ванне таких компонентов, как формальдегид – 0,5 см3/дм3, карбонат натрия – 1 г/дм3 и ПАВ – 6 г/дм3. Проведение процесса с применением микроорганизмов позволяет полностью исключить формальдегид, и карбонат натрия и ПАВ.

На первом этапе был проведен посев культуры 8 на скошенную синтетическую среду Рана, содержащую нерпичий жир в качестве источника углерода в количестве 10 кл/см3 на 500 см3. Культивирование проводили в колбах Эрленмейера объемом 250 см3 в термостате марки «ТС-80М-2» при температуре (37±0,5)˚С в течение 24 часов. После истечения заданного времени произвели смыв выросших культур со скошенной синтетической среды приготовленной жидкой средой Рана объемом 300 мл. и термостатировали, осуществляя переменное механическое воздействие на встряхивателе «Shaker Type-357», с частотой колебаний 200 об/мин, амплитудой 6 по 2 ч в сутки в течение 24 часов. Через каждые 24 часа приливали по 300 мл. стерильной жидкой синтетической среды Рана и определяли перед внесением среды такие показания как оптическая плотность, рН, КОЕ, суммарный продукт жизнедеятельности микроорганизмов. Результаты представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Влияние продолжительности культивирования на свойства бактериальной суспензии

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Показания | Продолжительность культивирования, ч | | | | | | | | | | | | | | | |
| 0 | | 24 | | 48 | | 72 | | 96 | | 120 | | 144 | | | 168 |
| рН | 7,92 | | 7,84 | | 7,78 | | 7,62 | | 7,60 | | 7,60 | | 7,57 | | | 7,60 |
| Кислотность, г/дм3 | 1,40 | | 1,40 | | 1,50 | | 1,70 | | 1,70 | | 1,60 | | 1,60 | | | 1,50 |
| Оптическая плотность D5402 | 7,50 | | 7,80 | | 8,50 | | 8,50 | | 8,10 | | 7,80 | | 7,30 | | | 6,60 |
| КОЕ | 2,30×106 | | 5,80×106 | | 4,30×106 | | 1,20×106 | | 7,50×106 | | 6,40×106 | | 8,20×106 | | | 7,6×106 |
| Показания | | Продолжительность культивирования, ч | | | | | | | | | | | | | | |
| 0 | | 24 | | 48 | | 72 | | 96 | | 120 | | 144 | 168 | |
| Сум-ый продукт жизн-ти, г/дм3 | | - | | 0,03 | | 0,03 | | 0,01 | | 0,04 | | 0,05 | | 0,05 | 0,05 | |
| Объем бактериальной суспензии, дм3 | | 0,50 | | 0,80 | | 1,10 | | 1,40 | | 1,70 | | 2,00 | | 2,30 | 2,60 | |

Для проведения процесса обезжиривания в присутствии микроорганизмов маточный раствор был приготовлен в четырех вариантах: в первом случае концентрированный раствор (100%), в остальных - с разбавлением: во втором случае – 75%, в третьем случае – 50% и в четвертом случае 25% от объема рабочей ванны. Также были отобраны образцы меховой овчины, размером 10×10 см по методу асимметрической бахромы (п.2.2.18). Процесс обезжиривания меховой овчины проводили в течение 45 минут при температуре 40˚С с переменным механическим воздействием на основе бактериальной суспензии без введения СПАВ и формалина.

Для исследования процесса обезжиривания было приготовлено 5 рабочих составов, характеристика которых представлена в таблице 7. В качестве контрольного варианта процесс обезжиривания проводили по типовой методике.

Таблица 7 – Характеристика рабочих ванн

|  |  |
| --- | --- |
| Состав ванны | Расход бактериальной суспензии от объема рабочей ванны, % |
| Состав1 | 100 |
| Состав2 | 75 |
| Состав3 | 50 |
| Состав 4 | 25 |
| Состав 5 | Типовая методика |

До и после процесса обезжиривания были сняты такие показания, как липолитическая, протеолитическая активности, содержание жировых веществ в кожевой ткани и волосяном покрове и колористические показатели волосяного покрова.

Расчет липолитической и протеолитической активностей состава ванны 1 (100% расход бактериальной суспензии от объема рабочей ванны) проводился аналогично расчетам при изучении толерантности исследуемых культур к факторам внешней среды. Результаты расчета представлены в таблице 8.

Таблица 8 – Показания липолитической и протеолитической активностей до и после проведения процесса обезжиривания

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Показания | До обезжиривания | После обезжиривания |
| Липолитическая активность, ед./гр. | 4,316 | 2,284 |
| Протеолитическая активность, ед./гр. | 2,27 | 1,86 |

Оценку содержания жира в волосе и кожевой ткани проводили на аппарате Зайченко (п.2.2.20) и рассчитывали по формуле (8).

Пример расчета содержания жировых веществ в кожевой ткани до процесса обезжиривания по типовой методике:

m = 112,6616 г.; m1 = 112,5058 г.; m2 = 0,5684 г.

(112,6616-112,5058) ×100%

X1 = = 27,41%

0,5684

Дальнейшие расчеты были проведены аналогичным образом.

Результаты определения содержания несвязанных жировых веществ представлены в таблице 9.

Таблица 9 – Содержание несвязанных жировых веществ в кожевой ткани и в волосяном покрове до и после проведения процесса обезжиривания

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Состав ванны | Топографический  участок шкуры | Содержание жировых веществ в кожевой ткани, % | | Содержание жировых веществ в волосяном покрове, % | |
| До обезжиривания | После обезжиривания | До обезжиривания | После обезжиривания |
| Состав1 | Вороток | - | 19,35 | - | 9,25 |
|  | Полы | - | 4,46 | - | 2,64 |
|  | Хребет | - | 17,96 | - | 8,21 |
| Состав2 | Вороток | - | 21,63 | - | 10,18 |
|  | Полы | - | 4,53 | - | 2,83 |
|  | Хребет | - | 19,32 | - | 8,76 |
| Состав3 | Вороток | - | 22,71 | - | 11,56 |
|  | Полы | - | 4,67 | - | 3,17 |
|  | Хребет | - | 20,27 | - | 10,50 |
| Состав 4 | Вороток | - | 23,52 | - | 12,32 |
|  | Полы | - | 4,72 | - | 3,44 |
|  | Хребет | - | 22,64 | - | 12,04 |
| Состав 5 | Вороток | 27,41 | 13,83 | 15,14 | 6,14 |
|  | Полы | 5,10 | 4,43 | 3,10 | 1,98 |
|  | Хребет | 26,41 | 13,79 | 13,17 | 5,79 |

Результаты, приведенные в таблице 9 показывают, что все составы обладают обезжиривающим действием. При сравнении проведения процесса обезжиривания по предложенной и типовой методике видно, что составы ванн 1-4 обладают меньшим обезжиривающим действием, чем состав рабочей ванны, проведенной по типовой методике. Вероятно, это связано с тем, что в состав ванн 1-4 не входил СПАВ, присутствие которого необходимо для обезжиривания и эмульгирования природного жира, содержащегося в волосе и кожевой ткани.

Диаграммы зависимости содержания жировых веществ в кожевой ткани и волосяном покрове по топографическим участкам от состава ванны представлены на рисунках 8, 9.



Рисунок 8 – Диаграмма зависимости содержания жировых веществ в кожевой ткани по топографическим участкам от состава рабочей ванны

Рисунок 9 - Диаграмма зависимости содержания жировых веществ в волосяном покрове по топографическим участкам от состава рабочей ванны



При сравнении обезжиривающего действия между концентрированным и разбавленным рабочим растворами можно отметить, что проведение процесса в концентрированных бактериальных суспензиях влечет за собой снижение содержания жировых веществ, как в волосе, так и в кожевой ткани. Однако, разница содержания жира в волосе и кожевой ткани после проведения процесса в концентрированных и разбавленных растворах бактериальных суспензий не на много отличается. Таким образом, наиболее целесообразным вариантом проведения обезжиривания меховой овчины в присутствии микроорганизмов является состав ванны 1 (100% расход бактериальной суспензии от объема рабочей ванны).

Типовая и предложенная методики показали снижение содержания жировых веществ в пределах ГОСТ (10-20% для кожевой ткани и 2% для волосяного покрова). По типовой методике после проведения процесса обезжиривания содержание жировых веществ в кожевой ткани уменьшилось в среднем на 46%, в волосяном покрове на 56%, а при использовании состава ванны 1 в отсутствии СПАВ в кожевой ткани уменьшилось количество жировых веществ на 29% и в волосяном покрове на 36%.

Также можно отметить, что полы являются таким топографическим участком, в котором содержится наименьшее количество жировых веществ(5,1% в кожевой ткани и 3,1% в волосяном покрове), а вороток содержит наибольшее количество жировых веществ(27,41% в кожевой ткани и 15,14% в волосяном покрове).

Колористические показатели волосяного покрова определяли на приборе «Пульсар» (п.2.2.18). Результаты исследования представлены в таблице 10.

Таблица 10 – Колористические показатели волосяного покрова до и после процесса обезжиривания

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Состав ванны | Топографический  участок шкуры | Белизна, баллы | | Желтизна, баллы | |
| До обезжиривания | После обезжиривания | До обезжиривания | После обезжиривания |
| Состав1 | Вороток | 70,40 | 77,96 | 22,71 | 17,56 |
|  | Полы | 72,59 | 74,11 | 20,34 | 25,22 |
|  | Хребет | 70,49 | 69,29 | 26,26 | 28,20 |
| Состав2 | Вороток | 68,39 | 74,19 | 22,56 | 22,31 |
|  | Полы | 72,94 | 77,80 | 15,43 | 22,37 |
|  | Хребет | 76,53 | 77,21 | 18,50 | 19,87 |
| Состав3 | Вороток | 78,11 | 75,55 | 17,82 | 18,32 |
|  | Полы | 71,60 | 71,17 | 22,81 | 26,45 |
|  | Хребет | 75,02 | 74,98 | 19,62 | 20,89 |
| Состав 4 | Вороток | 71,13 | 65,83 | 20,63 | 14,19 |
|  | Полы | 66,28 | 74,24 | 23,45 | 21,06 |
|  | Хребет | 76,93 | 75,16 | 18,75 | 24,16 |
| Состав 5 | Вороток | 74,83 | 82,00 | 19,38 | 78,84 |
|  | Полы | 73,91 | 86,45 | 23,64 | 20,49 |
|  | Хребет | 72,30 | 83,19 | 17,52 | 16,78 |

Диаграммы зависимости колористических показателей волосяного покрова до и после процесса обезжиривания по топографическим участкам от состава ванны представлены на рисунках 10, 11.



Рисунок 10 – Диаграмма зависимости белизны до и после процесса обезжиривания по топографическим участкам от состава ванны



Рисунок 11 - Диаграмма зависимости желтизны до и после процесса обезжиривания по топографическим участкам от состава ванны

На рисунках 10 и 11 наглядно видно, что максимальная величина белизны и желтизны после проведения процесса обезжиривания характерны для образцов состава ванны 5 (типовая методика). Вероятно, это связано с тем, что в обезжиривающей ванне присутствовало СПАВ в количестве 8 г/л, которое обладало обезжиривающим и моющим действием. При сравнении рабочих ванн 1-4, содержащих только бактериальную суспензию без СПАВ можно сказать, что максимальная величина белизны наблюдалась у образцов после процесса обезжиривания в рабочей ванне 1 (100% расход бактериальной суспензии от объема рабочей ванны), а минимальная величина белизны у образцов после обезжиривания в ванне 4. Максимальная величина желтизны характерна для ванны 3 с 50% расходом бактериальной суспензии от объема рабочей ванны.

После проведения процесса обезжиривания были определены характеристики вод, образовавшихся в результате проведения процесса. К таким параметрам относятся концентрация взвешенных веществ (п.2.2.16), активная реакция среды, химическое потребление кислорода (ХПК) (п.2.2.17), кислотность, мутность и суммарный продукт жизнедеятельности микроорганизмов.

Определение концентрации взвешенных веществ рассчитывается по формуле (5).

Пример расчета содержания взвешенных веществ для состава ванны 1:

*m1* = 14,4178 г; *m2* = 14,3938 г; *V* *=* 50 см3

(14,4178-14,3938) ×1000 × 1000

X1 = = 480 мг/дм3

50

Дальнейшие расчеты проводили аналогичным образом.

Определение химического потребления кислорода (ХПК) рассчитывается по формуле (6).

Пример расчета ХПК для состава ванны 1:

V1 = 0,4 см3; V2 = 0,3 см3; k = 0,82; V = 1 см3.

(0, 4-0,3) ×0,82×0,25×8×1000×50

ХПК = 1 = 8200 мгО2/дм3

Дальнейшие расчеты проводили аналогичным образом. Результаты расчета представлены в таблице 11 и на рисунках 12, 13.

Таблица 11 – Характеристика сточных вод после проведения процесса

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Состав  ванны | Содержание взвешенных веществ, мг/дм3 | рН | ХПК мгО2/дм3 | Кислотность, г/дм3 | Оптическая плотность D5402 | Сум-ый продукт жизн-ти, г/дм3 |
| Состав1 | 480 | 7,61 | 8200 | 1,20 | 1,20 | 0,04 |
| Состав2 | 440 | 7,55 | 6560 | 0,84 | 1,20 | 0,03 |
| Состав3 | 380 | 7,55 | 5740 | 0,60 | 2,20 | 0,04 |
| Состав 4 | 350 | 7,57 | 4100 | 0,30 | 5,70 | 0,04 |
| Состав 5 | 616 | 7,55 | 13120 | 0,60 | 40,00 | - |



Рисунок 12 – Динамика изменения содержания взвешенных веществ



Рисунок 13 - Динамика изменения содержания химического потребления кислорода

Анализируя данные, представленные в таблице 11 и на рисунках 12, 13 можно отметить, что пробы сточной воды ванн 1(100% расход бактериальной суспензии от объема рабочей ванны) и 5 (типовая методика) характеризуются максимальным содержанием взвешенных веществ 480 мг/дм3 и 616 мг/дм3 соответственно и максимальным химическим потреблением кислорода 8200 мгО2/дм3 и 13120 мгО2/дм3 соответственно. При рассмотрении динамики изменения содержания взвешенных веществ и химического потребления кислорода у проб сточной воды ванн 1-4, содержащих бактериальную суспензию с разными концентрациями видно, что происходит уменьшение данных показателей с уменьшением концентрации бактериальной суспензии. Снижение показаний ХПК связано с микробной деструкцией органических веществ в исследуемых сточных водах, а увеличение содержания взвешенных веществ в пробах сточной воды указывает на максимальное удаление минеральных примесей.

Следует отметить, что сточные воды в составах 1-4 характеризуются отсутствием СПАВ и такого контаминанта, как формальдегид, наличие которого в сточных водах крайне нежелательно. Наиболее оптимальным вариантом проведения процесса обезжиривания меховой овчины с применением микроорганизмов является состав 1 с расходом бактериальной суспензии 100% от объема рабочей ванны.

В результате проведенной работы была разработана схема биотехнологического обезжиривания консорциумом микробных продуцентов, представленная на рисунке 14.

Экобиотехнологическое обезжиривание

Подготовка продуцентов биомассы

(посев культур микроорганизмов на скошенный агар)

Приготовление среды Рана:

На 1 дм3 воды (г/дм3): К2HPO4-5,0; (NH4)3РO4-5,0; KCl-следы; СаCl2-1,0; MgSO4 Х 7H2O-1,0; FeCl3 Х 7H2O-следы. В качестве источника углерода используют нерпичий жир в количестве 1 г/дм3.

Приготовление бактериальной суспензии

(заражение синтетической среды Рана микроорганизмами)

Условия культивирования:

Температура (38±0,5)˚С

Продолжительность 24 часа

Механическое воздействие на встряхивателе «Shaker Type-357», с частотой колебаний 200 об/мин, амплитудой 6 по 2 ч в сутки в течение 24 часов

КОЕ = 103 кл/см3

Показания готовой бактериальной суспензии:

Температура 40˚С

ЖК = 15

рН = 7,5

КОЕ = 105 кл/см3

Протеолитическая активность 2,27 ед./гр.

Липолитическая активность 4,316 ед./гр.

Дальнейшие процессы обработки меховой овчины проводятся согласно Единой технологии обработки меховых овчин

Рисунок 14 - Схема биотехнологического обезжиривания

**4 Экономическая часть. Расчет экономической эффективности экобиотехнологического процесса обезжиривания меховой овчины**

В настоящее время сложная экологическая обстановка и рыночные отношения предъявляют предприятиям легкой промышленности ряд новых требований: предприятия должны выпускать конкурентоспособную продукцию, удовлетворяющую требованиям потребителя, не оказывая при этом пагубного техногенного воздействия на экосистему.

Предприятия меховой и шубной промышленности занимают одно из первых мест в числе загрязнителей окружающей среды. На всех этапах выделки овчин образуются высокотоксичные воды, содержащие такие контаминанты, как синтетические поверхностные вещества, формальдегид, жировые вещества, минеральные кислоты и соли. В связи с этим широко проводятся научно-исследовательские работы по снижению токсичности отработанных вод после проведения различных процессов в технологическом цикле.

В данной работе предложен метод проведения процесса обезжиривания меховой овчины ферментным препаратом высокой липолитической активности, продуцируемым прокариотическими организмами. Проведение обезжиривания по указанному методу позволяет получить полуфабрикат, удовлетворяющий требованиям ГОСТа и значительно снизить токсичность образуемых сточных вод.

Экономическая эффективность данного процесса достигается за счет снижения затрат на химматериалы, транспортно-заготовительные расходы и прочие затраты.

На первом этапе были рассчитаны затраты на воду и химматериалы согласно формулы (9):

С = V×Ц, (9)

где С – затраты на воду, руб;

V – расход материала на 1000 дм2;

Ц – цена за единицу материала, руб

Результаты расчета затрат на воду и химические материалы представлены в таблице 12. Расчеты были произведены на калькуляционную единицу, величина которой для меховой овчины составляет 1000 дм2.

Таблица 12 – Затраты на воду и химматериалы на калькуляционную единицу

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Наименование | Единица измерения | | Расход на 1000 дм2 | | | | Цена за единицу, руб | | Затраты, руб | | |
| Типовой вариант | | Новый  вариант | | Типовой  вариант | | Новый  вариант |
| СПАВ | кг | | 1,890 | | 0,378 | | 100,00 | | 189,00 | | - |
| Формалин | дм3 | | 0,189 | | - | | 31,00 | | 5,86 | | - |
| Карбонат натрия | кг | | 0,189 | | - | | 30,00 | | 5,67 | | - |
| Вода | м3 | | 0,378 | | 0,378 | | 6,21 | | 2,35 | | 2,350 |
| Калий фосфорнокислый  2-замещенный | кг | - | | 0,567 | | 156,00 | | - | | 88,452 | |
| Кальций хлористый | кг | - | | 0,378 | | 52,00 | | - | | 19,656 | |
| Аммоний фосфорнокислый  1-замещенный | кг | - | | 0,567 | | 91,00 | | - | | 51,597 | |
| Магний сернокислый | кг | - | | 0,378 | | 38,00 | | - | | 14,364 | |
| Нерпичий жир | кг | - | | 0,378 | | 50,00 | | - | | 18,900 | |
| Итого: |  |  | |  | |  | | 202,88 | | 195,319 | |

В представленной таблице показано, что опытный вариант проведения процесса обезжиривания при помощи микробных продуцентов значительно позволяет сократить расходы на химматериалы благодаря исключению из технологического процесса формальдегида, карбоната натрия и СПАВ. Транспортно заготовительные расходы составляют 7% от стоимости химматериалов и составляют для типового варианта – 14,2 руб, для нового варианта –13,67 руб.

Прочие затраты составляют 10-15% от суммы предыдущих изменяющихся статей затрат, таким образом, для типового варианта данная величина составила – 30,43 руб., для нового – 29,3 руб.

Изменяющиеся статьи затрат представлены в таблице 13.

Таблица 13 – Изменяющиеся статьи затрат на 1000 дм2 готовой продукции

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Статьи затрат | Типовой способ обработки | Предлагаемый способ обработки |
| Стоимость химматериалов | 202,880 | 195,319 |
| Транспортно-заготовительные расходы | 14,200 | 13,670 |
| Прочие затраты | 30,430 | 29,300 |
| Общий итог, руб: | 247,510 | 238,289 |

Из таблицы 13 видно, что экономическая эффективность процесса обезжиривания меховой овчины с использованием бактериальной суспензии достигается за счет снижения затрат на химматериалы с 202,88 до 195,319 руб; на транспортно-заготовительные расходы с 14,2 до 13,67 руб; на прочие затраты с 30,43 до 29,3 руб. Общий итог изменяющихся статей затрат снижается с 247,51 рублей (типовой вариант) до 238,289 руб – при использовании предлагаемой методики проведения процесса обезжиривания (9,221 руб.)

При использовании данного метода остальные статьи затрат, к которым относятся затраты на основную и дополнительную заработную плату, на амортизацию зданий и оборудования и др., остаются неизменными, что обусловлено одинаковыми параметрами проведения данного процесса по разным технологиям – в обоих случаях процесс обезжиривания проводится окуночным методом с продолжительностью – 45 минут.

Годовой экономический эффект рассчитывается по формуле (10):

*Э* = , (10)



где *Э* – годовой экономический эффект, руб;

*С1* – сумма статей затрат для опытной технологии, руб;

*С* – сумма статей затрат по типовой методике, руб;

*Мз* – мощность предприятия, дм2/год.

При мощности завода 20 млн.кв.дм. составит 184420 руб, а на 1000 дм2 – 9,22 рублей.

Таким образом, был произведен расчет экономической эффективности процесса, который составил 9,22 рублей на 1000 дм2. Следовательно, применение микроорганизмов-деструкторов жировых веществ при проведении процесса обезжиривания позволит не только снизить токсичность образуемых сточных вод и получить полуфабрикат, удовлетворяющий требованиям ГОСТа, но и значительно сократить затраты на данном этапе выделки меховой овчины.

**5 Безопасность жизнедеятельности**

Проблема обеспечения безопасности человека особенно проявляется на предприятиях где зоны формирования различных опасных и вредных факторов практически пронизывают всю производственную среду, в которой осуществляется трудовая деятельность персонала. В тоже время проблемы обеспечения безопасности рабочих на меховых предприятиях можно условно разделить на проблемы, характерные для любого объекта хозяйственной деятельности, и проблемы связанные со спецификой технологических процессов, организации производства и дислокации предприятия.

Основной задачей безопасности жизнедеятельности является систематический контроль за проведением мероприятий по созданию здоровых условий труда, контроль за соблюдением руководителями подразделений законов, приказов по вопросам охраны труда, а также требований, правил, норм и инструкций по технике безопасности, контроль за обеспечением рабочих средствами индивидуальной защиты и предохранительными приспособлениями.

Техника безопасности представляет собою комплекс методов, технических средств и приемов работы, полученных в результате изучения, анализа и разработок, осуществление которых дает возможность создать безопасные условия труда.

Необходимым условием успешной борьбы с производственным травматизмом, профессиональными отравлениями и заболеваниями на предприятии и создания безопасных условий труда на нем является инструктаж и обучение рабочего правильным и безопасным методам работы на отведенном ему участке или оборудовании. Все без исключения рабочие должны хорошо знать и выполнять правила и инструкции по технике безопасности и производственной санитарии.

В производственных условиях на организм человека воздействует ряд факторов, оказывающих вредное влияние на его здоровье. Эти факторы называются профессиональными вредностями. Они могут быть вызваны непосредственно технологическими процессами, некоторыми свойствами сырья или вспомогательных материалов, режимом труда и обстановкой труда.

Профессиональные вредности могут вызвать специфические заболевания (хронические и острые), если работающий будет постоянно и длительное время подвергаться их воздействию. В результате могут прогрессировать болезни, не связанные с его работой на производстве, ухудшаться общее состояние и все вместе взятое снизить сопротивляемость его организма внешним воздействиям, что ведет к понижению его трудоспособности, а иногда к частичной и даже полной ее потере.

Для каждого производства характерны свои профессиональные вредности, обусловленные характером производственных процессов.

В условиях кожевенно-мехового производства они могут быть вызваны повышенными температурой и влажностью окружающего воздуха, выделением вредных газов и паров, некоторыми свойствами применяемых материалов (например, хромовых солей), образованием пыли и т.п. [54].

Помещение химических лабораторий по своему устройству, оснащению, оборудованию и планировке должны отвечать требованиям строительных норм и правил (СНиП), санитарных норм проектирования промышленных предприятий (СНиП 247-1), указания по строительному проектированию предприятия, зданий сооружений - химической промышленности (СН 119-70).

Учебные и научные лаборатории, предназначенные для работы с химическими материалами, должны иметь энергоснабжение (переменный, постоянный ток), подводку холодной и горячей воды, газа. Оборудование должно быть заземлено.

Категории помещений лабораторий по взрывной, взрывоопасной и пожарной опасности и степени огнеопасности должны приниматься в соответствии с СНиП 11-М.2-72 и СНиП 11-А.5-70. Здания лабораторий должны быть не ниже второй степени огнестойкости.

Стены, потолки и поверхности конструкции помещений, в которых работают с ядовитыми или агрессивными веществами, должны быть облицованы материалами, предотвращающими сорбцию паров, веществ и допускающими легкую их чистку, дегазацию и мытье.

Для работы с вредными легко летучими веществами лаборатории оборудуют вытяжными шкафами с верхним и нижним отсосом.

Для тушения возможных загорании и пожаров лаборатории должны быть оснащены необходимыми средствами пожаротушения.

Химическая лаборатория имеет специфические особенности условий труда, связанные с использованием вредных, пожаро- и взрывоопасных веществ. Эффективная работа химической лаборатории возможна лишь при условии полной безопасности ее сотрудников [55].

Мероприятия по обеспечению безопасности проведения учебных занятий и труда с вредными веществами должны предусматривать замену вредных веществ на менее вредные; сухих способов переработки пылящих материалов мокрыми; исключение образования, выделения токсичных веществ, пыли; создание замкнутой, безотходной технологии; обеспечение герметичности и прочности используемого оборудования; создание систем улавливания, очистки, нейтрализации выбросов химических веществ; включение токсикологических характеристик вредных химических веществ в технологические регламенты, описания лабораторных работ, паспорта помещений [56].

К работе в лаборатории допускаются лица не моложе 18 лет, прошедшие инструктаж и обучение безопасным методам работы. Ежеквартально должны проводиться повторные инструктажи. Сотрудники лаборатории обязаны знать свойства имеющихся в лаборатории химических реактивов, технических продуктов, продуктов реакции и синтезируемых веществ, поступающих в лабораторию для анализа, особенно их токсичность, огнеопасность и взрывоопасность; опасные моменты при проведении работ в лаборатории и способы их предупреждения; профессиональные вредности данных работ и методы борьбы с ними, меры первой (до врачебной) помощи при отравлениях, ожогах, поражениях электричеством и прочих несчастных случаев; инструкции по противопожарным мерам, освоить противопожарный инвентарь и правила пользования им. Ознакомление с инструкцией по технике безопасности сотрудников должно подтверждаться личными подписями инструктируемого и проводившего инструктаж в журнале инструкций по технике безопасности, имеющимися в лаборатории.

Работника нарушившего правила и инструктаж по технике безопасности, подвергают в обязательном порядке внеочередному инструктажу - проверке знаний независимо от административных мер, принятых по отношению к нарушителю [57].

Помещения, где используются химические вещества, запрещается размещать в жилых домах и общежитиях [58].

Пожары при нагревании, прокаливании, высушивании и других работах могут произойти: от неисправности нагревательных приборов, электрических проводов, при несоблюдении мер предосторожности.

При проведении нагревания под нагревательный прибор обязательно нужно класть толстый лист асбеста и стараться вести нагревание не на деревянном столе. Иногда рекомендуется подкладывать под нагревательный прибор лист железа. Конечно, во многих случаях это помогает, но, вообще говоря, это плохая мера предосторожности, так как если железный лист сильно нагреется, то дерево под ним начинает тлеть. Поэтому необходимо применять тепловую изоляцию из негорючего материала с низкой теплопроводностью. Наилучшей изоляцией, доступной в лаборатории, является асбест.

Особой осторожности требует нагревание огнеопасных веществ, таких как диэтиловый эфир и спирт, так как пары могут легко загореться, если при работе с этими веществами пользоваться горелками всех видов и электроплитками. Поэтому все операции, связанные, а нагреванием, следует проводить на предварительно нагретой водяной бане с потушенной горелкой. При работе с эфиром нужно всегда иметь под рукой листовой асбест, песок, войлок и т.п.

Если бутыль или другой сосуд с огнеопасным веществом разобьется, то прежде чем собирать осколки, разлитую жидкость следует засыпать песком. После этого осторожно собирают осколки стекла и сгребают песок, пропитанный пролитой жидкостью, на деревянную лопатку или фанеру. Применять железную лопату нельзя, так как при этом возможно образование искры от трения по каменному, цементному или плиточному полу. Ввиду того, что около жидкости всегда будет взрывоопасная концентрация паров, искра может вызвать их воспламенение. При сгребании веником или щеткой стеклянных осколков с каменного пола может также возникнуть статический электрический заряд с образованием искры, что неизбежно приведет к взрыву и воспламенению огнеопасной жидкости, разлитой на полу [59].

Способ тушения пожара зависит от причины, обусловившей его возникновение, так и от характера горячего объекта. Если в лаборатории возник пожар и есть угроза его распространения, то, пользуясь имеющимися под руками средствами тушения, одновременно нужно вызвать и местную пожарную охрану.

Если загорелись деревянные предметы, пожар нужно тушить водой, песком и с помощью огнетушителя.

Если горит нерастворимое в воде вещество, например диэтиловый эфир, то нельзя применять для тушения воду, потому что пожар не только не будет ликвидирован, но даже может усилиться. Многие огнеопасные вещества легче воды и при соприкосновении с ней образуют горячую пленку. Чем больше будет воды, тем больше по площади будет горящая пленка и тем опаснее пожар.

Нерастворимые в воде органические вещества следует тушить песком или же накрыванием асбестом или кошмой. Нужно именно накрывать ими очаг пожара, а не набрасывать, чтобы горящие брызги не разлетались в стороны.

Если горящее вещество растворимо в воде, например спирт, его можно гасить водой.

Во всех случаях весьма пригодным средством тушения является четыреххлористый углерод. При соприкосновении с огнем он образует тяжелые пары, обволакивающие горящее место; доступ воздуха уменьшается и горение прекращается.

Для тушения пожаров в лаборатории можно применять также специальные солевые растворы, которые следует иметь в запасе в особых бутылях, установленных на определенном месте, или в больших ампулах, которые бросают в пламя на горящий предмет так, чтобы ампула разбилась. Хорошо действует насыщенный раствор углекислого натрия.

При тушении водой горящих стен, столов и пр. струю воды следует направлять на низ пламени. Если в лаборатории нет пожарного крана, нужно быстро надеть на водопроводный кран резиновую трубку и тушить, как согласно выше.

Когда горит лабораторный стол, одновременно с тушением огня нужно быстро удалить близко стоящие огнеопасные вещества в безопасное место. Никогда не следует иметь около себя и в рабочем лабораторном столе большие запасы огнеопасных веществ, а также хранить их под столами или в рабочем помещении.

Самым необходимым противопожарным средством в лаборатории являются огнетушители; их существует несколько типов, и в зависимости от характера работ в лаборатории следует иметь огнетушители соответствующей системы [60].

В лаборатории организована механическая приточно-вытяжная вентиляция. Рекомендуется делать приток воздуха несколько меньшим, чем отток, для того чтобы исключить возможность проникания газообразных веществ за пределы лаборатории. При определении необходимой подачи вытяжной и приточной вентиляции следует учитывать все вредные факторы, фактически имеющиеся в лаборатории. Вентиляция должна обеспечивать требуемый приток чистого воздуха, удаление загрязнении воздушной среды, поддерживания в лаборатории необходимого микроклимата.

Мощность вентиляции должна быть рассчитана на вещества, имеющих максимальное ПДК (максимальную вредность). При работе с токсичными и вредными веществами мощность приточно-вытяжной вентиляции должна обеспечивать не менее 15- кратный обмен воздуха в час.

Вытяжные шкафы в лабораториях выполняют не металлических конструкций. Остеклять шкафы в лабораториях желательно армированным стеклом. При работе в вытяжном шкафу разрешается открывать окна не более чем на половину проема. Освещение вытяжного шкафа должно быть во взрывобезопасном исполнении, а электропроводку выполняют в соответствии с требованиями к электропроводке во взрывоопасном помещении.

Пол в химической лаборатории целесообразно покрывать линолеумом. При выборе материала облицовки рекомендуется отдавать предпочтение тем, которые имеют гладкую поверхность, плохо сорбируют вредные вещества, не коррозируют, легко очищаются водой или растворителями.

Современная химическая лаборатория должна быть обеспечена централизованной подачей горячей и дистиллированной воды; системой, осуществляющей нагревание (горючий газ, приборы электронагрева); электроэнергией для освещения и работы; системами вентиляции и канализации; аварийной вентиляцией.

В химической лаборатории при проведении физико-химических анализов, исследователи применяют токсичные и вредные вещества: хлориды, кислоты (азотная, серная, соляная, муравьиная), ацетон, спирты и т.п. При хранении легко воспламеняющихся жидкостей (ацетона, спиртов) надо следить за температурой воздуха в хранилище, учитывать, что все эти вещества легко воспламеняются даже от небольшой искры.

Работа в химической лаборатории связанна с непрерывным применением различных реактивов. Поэтому каждая лаборатория имеет их запах. На каждом сосуде, где хранятся химические материалы должны быть наклейки с названием данного препарата и сроком его изготовления.

Работающие в лаборатории должны знать основные свойства применяемых ими реактивов, особенно степень их ядовитости и способности к образованию взрывоопасных смесей с другими реактивами. Большой урон здоровью и тяжелые последствия приносит неумелое обращение с ядовитыми и вредными веществами. Ядовитые вещества могут действовать на организм человека при вдыхании их, при попадании на кожу или внутрь [61].

Химические реакции необходимо выполнять с таким количеством и концентрациями, в такой посуде и приборах и в тех условиях, как это указано в соответствующем разделе методических указаний.

Отбор концентрированной соляной кислоты для приготовления 0,5 н. раствора нужно производить только с помощью всасывающей груши. Все опыты, проводимые с диэтиловым эфиром и спиртом необходимо проводить только в вытяжном шкафу. Во время разливки эфира запрещается иметь в этом помещении открытое пламя: зажженные горелки, спички и т.д. То же относится и к его перегонке и экстрагированию. Для этих целей применяют электрические горелки закрытого типа. Запрещается нагревать жидкость в закрытых сосудах. Если воспламениться спирт или эфир нужно немедленно накрыть пламя войлоком или засыпать пламя песком. Все без исключения реактивы нельзя пробовать на вкус, так как большинство в той или в иной мере ядовиты. Наливая или нагревая реактивы, не наклоняться над сосудом, вследствие возможного разбрызгивания и даже выброса жидкости, а отсюда ожог лица. Нагревая колбы, не следует держать их отверстием к себе или в сторону находящегося рядом товарища.

Перед уходом из лаборатории необходимо убрать за собой рабочее место, проверить выключены ли все нагревательные приборы, электроприборы [62].

Микробиологическая лаборатория предназначена для подготовки и проведения различных микробиологических исследований. Помещения лаборатории должны быть изолированы от других объектов. В ее состав входят: комната для микробиологических исследований (бокс); автоклавная (стерилизационная); моечная, оборудованная для мытья посуды; препараторская, где проводят подготовку лабораторной посуды и хранят питательные среды; материальная комната – для хранения запасов реактивов, посуды, аппаратуры, приборов, хозяйственного инвентаря.

Для проведения посевов, стерильной разливки сред и других работ с соблюдением правил асептики в помещении для исследований устраивают застекленный бокс шлюзом, общей площадью до 5 квадратных метров.

Организация и оборудование микробиологических лабораторий в учебных заведениях должны соответствовать производственным.

Рабочий стол должен быть всегда чистым, а используемые для работы предметы – аккуратно разложены.

При работе, как в производственных, так и в учебных лабораториях необходимо учитывать то, что объектом исследования являются микроорганизмы, которые при неумелом обращении с ними могут вызвать болезни у человека. В связи с этим материалы и культуры микроорганизмов, используемые для учебных занятий, должны рассматриваться как потенциально опасные. Поэтому работающие в лабораториях сотрудники и студенты обязаны знать и соблюдать правила, обеспечивающие предотвращение обсеменения объектов внешней среды микроорганизмами и личную безопасность работающего.

Работать в лаборатории разрешается только в специальной одежде – халате, шапочке или косынке. Причем халат должен быть застегнут на все пуговицы, а волосы убраны под головной убор. Выходить за пределы лаборатории в спецодежде, выносить из лаборатории пробирки с культурами, препараты (мазки) и другие предметы категорически запрещается [63].

В лаборатории запрещается курить, принимать пищу и воду (в том числе и конфеты).

Культуры микроорганизмов, стерильную воду, питательные среды в пробирках, а также бактериологические петли нельзя класть на стол – их необходимо ставить в штативы. Использованные пипетки, предметные и покровные стекла, шпатели, ватные тампоны и прочее помещают в сосуды с дезинфицирующей жидкостью (1%-ный раствор хлорамина и др.). Пинцеты и бактериологические петли, препаровальные иглы, и другие мелкие металлические предметы после соприкосновения с культурой стерилизуют путем прокаливания в пламени горелки и только после этого помещают в штатив или банку. Категорически запрещается оставлять указанные предметы не стерилизованными.

Отработанные культуры микроорганизмов, а также другие загрязненные материалы и предметы по указанию лаборанта складывают в специальные бюксы и затем стерилизуют в автоклавах.

В случаях, когда культура микроорганизмов попадает на стол и другие предметы, необходимо при помощи ватного тампона, смоченного дезраствором, собрать ее, а загрязненное место тщательно обеззаразить дезинфицирующим раствором. При попадании загрязненного культурой материала на кожу, конъюнктиву или в рот принимают экстренные меры к обеззараживанию.

Перед уходом из лаборатории снимают халаты, руки обрабатывают дезинфицирующим раствором и тщательно их моют.

Меры первой доврачебной помощи пострадавшим при работе с химическими веществами

При несчастном случае пострадавшему должна быть оказана первая доврачебная помощь, по необходимости, вызван врач. До прибытия медицинского работника пострадавшему должен быть обеспечен покой, приток свежего воздуха.

При термических ожогах обожженное место следует присыпать бикарбонатом натрия (содой), крахмалом, тальком или сделать примочки из свежеприготовленных 2%-ных растворов соды, перманганата марганца или неразбавленного этилового спирта.

При ожогах химическими веществами, особенно кислотами и щелочами, пораженный участок кожи следует быстро промыть большим количеством воды, после чего на обожженное место наложить примочку: при ожогах кислотой – из 2%-ного раствора соды, при ожогах щелочью – из 1 – 2%-ного раствора уксусной кислоты.

При попадании в глаза брызг кислоты необходимо их промыть обильным количеством воды, а затем 3%-ным раствором соды. При попадании в глаза посторонних предметов, удаление их должен производить только медицинский работник.

При воспламенении одежды необходимо загасить огонь на пострадавшем , набросив на него асбестовое или шерстяное покрывало. Погасив огонь, приступить к оказанию первой помощи.

При порезах рук или других частей тела стеклом необходимо удалить из ранки мелкие осколки, после чего промыть ее 2%-ным раствором перманганата калия или этиловым спиртом, смазать йодной настойкой и забинтовать.

При поражении электрическим током находящемуся в сознании пострадавшему необходимо обеспечить покой и чистый воздух.

При нарушении или прекращении дыхания и сердечной деятельности следует применять искусственное дыхание и непрямой массаж сердца до прибытия скорой медицинской помощи [64].

**6 Охрана окружающей среды. Биологическая очистка сточных вод кожевенных и меховых предприятий**

В современных условиях природная вода участвует не только в естественном, но и в антропогенном круговороте. В антропогенном цикле вода из природного водоема используется в энергетике, промышленности, сельском хозяйстве, для питьевого водоснабжения, коммунально-бытовых нужд. Значительная часть воды после ее использования возвращается в виде сточных вод. По определению сточные воды – это воды, использованные на бытовые или производственные нужды и получившие при этом дополнительные примеси, изменившие их первоначальных химический состав или физические свойства, а также атмосферные воды, стекающие с территорий промышленных предприятий или сельскохозяйственных угодий [65].

Сточные воды кожевенного и мехового производства представляют собой сложные гетерогенные многокомпонентные системы, относящиеся к группе высококонцентрированных и токсичных. Сточные воды образуются после проведения основных жидкостных процессов: отмока, золение, пикелевание, обезжиривание, дубление, крашение и т.д. В них содержатся химические материалы, как вносимые для проведения технологического процесса, так и образующиеся в результате переработки кожевенно-мехового сырья. Вследствие значительного количества органических веществ сточные воды могут подвергаться загниванию [53].

При обработке пушно-мехового и овчинно-шубного сырья на предприятиях меховой промышленности образуется значительное количество сточных вод, характер которых определяется спецификой технологических процессов, осуществляемых в конкретном производстве. Сточные воды предприятий меховой промышленности содержат большое количество трудноокисляемых органических веществ (шерстный и натуральный жиры, красители различной химической природы, ПАВ), а также токсичные соединения (трех- и шестивалентного хрома) в совокупности с минеральными (в основном серной) и органическими кислотами. Наиболее рациональным способом водоотведения стоков таких предприятий является раздельная схема отведения отмочно-моечных, хромсодержащих и красильных сточных вод, которая позволяет с наименьшими затратами осуществлять их обезвреживание, а также использовать очищенные сточные воды в оборотном водоснабжении предприятия [66].

Для сточных вод отдельных процессов мехового производства рН колеблется в широких пределах: от 3,5 до 8,5, однако общий сток представляет собой нейтральную среду с рН около 6,5.

Содержание загрязнений в сточных водах кожевенно-меховой промышленности столь велико, что в случае поступления последних в нативные водные объекты, может вызвать необратимые процессы, включая полное разрушение сложившейся экосистемы. Для охраны водных объектов используется комплекс мер, включающий классификацию водных источников по назначению, установление стандартов на воду и нормативов на сброс сточных вод.

В целом, состав сточных вод обусловлен видом перерабатываемого сырья. Данные воды имеют высокую концентрацию и большое количество ингредиентов: кусочки мездры, сырья и полуфабрикатов, шерсть, сгустки крови, грязь, синтетические ПАВ, консервирующие вещества, сульфиды, растворенные белки, жиры, соли хрома и алюминия и пр.

На кожевенно-меховых предприятиях, кроме производственных, образуются бытовые и атмосферные сточные воды. С территории предприятий их отводят отдельными сетями. Бытовые сточные воды сбрасываются в городскую канализационную систему, а дождевые и производственные сточные воды сбрасываются в эту систему или водоем после предварительной их очистки на локальных очистных сооружениях. В противном случае, поступление сточных вод в водоем может привести к ряду тяжелых нарушений гидробиологического режима.

Сточные воды кожевенных и меховых предприятий относятся к третьей группе, так как в состав данных вод входят как минеральные, так и органические вещества. К минеральным веществам относятся соли: сульфаты, хлориды, сульфиды, соединения хрома и др. К органическим – синтетические и растительные дубители, продукты распада белков, поверхностно-активные вещества, жиры.

Вследствие значительного количества органических веществ, сточные воды подвержены загниванию [67].

В настоящее время помимо физических и физико-химических методов очистки сточных вод широко применяется биологический метод очистки.

Биологическая очистка сточных вод основана на способности микроорганизмов использовать растворенные и коллоидные органические загрязнения в качестве источника питания в процессах своей жизнедеятельности. Биологическая очистка сточных вод может осуществляться как в естественных условиях (поля орошения, поля фильтрации, биологические пруды), так и в специальных сооружениях (аэротенки, биофильтры). Искусственное культивирование микроорганизмов в специально созданных для них благоприятных внешних условиях (состав питательной среды, избыток растворенного кислорода, температура) резко ускоряет биологическую очистку сточных вод, хотя и требует дополнительных затрат [52].

Предложено еще одно определение биологической очистки. Биологическая очистка сточных вод представляет собой биологическое окисление - широко применяемый на практике метод очистки производственных сточных вод, позволяющий очистить их от многих органических примесей. Процесс этот, по своей сущности, природный, и его характер одинаков для процессов, протекающих в водоеме или очистном сооружении. Биологическое окисление осуществляется сообществом микроорганизмов (биоценозом), включающим множество различных бактерий, простейших и ряд более высокоорганизованных организмов - водорослей, грибов и т. д., связанных между собой в единый комплекс сложными взаимоотношениями (метабиоза, симбиоза и антагонизма). Главенствующая роль в этом сообществе принадлежит бактериям, число которых варьирует от 10 6 до 10 14 клеток на 1 г сухой биологической массы (биомассы). Число родов бактерий может достигать 5 - 10, число видов - нескольких десятков и даже сотен.

Такое разнообразие видов бактерий обусловлено наличием в очищаемой воде органических веществ различных классов. Если же в составе сточных вод присутствует лишь один или несколько близких по составу источников органического углерода, т. е. один или несколько близких гомологов органического соединения, то возможно развитие монокультуры бактерий [45].

**Биологический способ очистки сточных вод от жировых веществ**

Общие стоки кожевенных и меховых предприятий содержат до 1800-2460 мг/дм3 жиров или жироподобных веществ. В стоках от процессов отмоки и дубления их количество достигает более 4 г/дм3. Отработанные жидкости после обезжиривания, промывки свиного сырья и полуфабриката, а также после золения этого сырья содержат еще больше жира. После обезжиривания свиных шкур карбонатом натрия (15-17 г/дм3) в растворе образуется стойкая жировая эмульсия с содержанием жира 8-10 г/дм3. Значительное количество его содержится также в стоках клееварочных цехов. Так на Могилевском кожевенном заводе в стоках указанного цеха содержание жира достигает 8,3 г/дм3 [52].

В настоящее время помимо физических и физико-химических методов очистки широко применяется биологический метод, основанный на жизнедеятельности микроорганизмов – деструкторов жировых веществ.

С учетом того обстоятельства, что сточные воды, содержащие жировые вещества имеют в основном повышенную температуру, селектировано несколько видов термофильных микроорганизмов, способных разрушать жиры при температуре свыше 50оС [68]. К таким культурам относятся Acinetobacter species, Rhodococcus species. Эффект очистки при таком способе достигает 100%.

Исследователями из Великобритании предлагается использовать специальное устройство для удаления масел и жиров из сточных вод [69]особенностью такого способа очистки является то, что для деструкции жиров и масел используются специальные культуры микроорганизмов, которые подаются в сточные воды из емкости с содержащей их жидкостью дозатором. Для увеличения эффективности очистки используется эффект флотации: воздух подается в диспергатор на дне.

Микроорганизмы-деструкторы предлагается использовать не только для разрушения жировых примесей, но и для нейтрализации других органических веществ, так, английскими исследователями French W.T., Brown L.R. [50] предлагается использовать микроорганизмы вида Burkholderia cepacica в процессе регенерации адсорбентов, применявшихся для выделения трихлорэтилена.

**Биологический способ очистки сточных вод от соединений хрома (VI)**

Очистка производственных сточных вод от хрома (VI) имеет очень важное значение. Попадая вместе со сточными водами в водоем, хром губительно действует на флору и фауну, ухудшает органолептические свойства воды, тормозит процессы самоочищения водоема.

К настоящему времени разработаны и внедрены в практику различные способы очистки воды от хрома: химические (реагентные), сорбционные, флотация, электрохимические и биологические.

Биологический способ очистки хромсодержащих сточных вод характеризуется следующими преимуществами: непрерывность процесса, значительное сокращение количества образующегося осадка по сравнению с реагентными способами, снижение эксплуатационных затрат по сравнению с химическими и физико-химическими.

К бактериям, способным трансформировать высокотоксичный шестивалентный хром в малотоксичный, относятся бактерии родов Pseudomohas, Aeromonas и Escherihia. Они могут спокойно переносить концентрацию ионов Cr6+ выше 200 мг/л, время очистки составляет от 1 до 3 суток. При увеличении концентрации хроматов до 350 и 500 мг/л время очистки возрастает соответственно до 20 и 60 сут.

Недостатком способа является то, что микроорганизмы не всегда или трудно приспосабливаются к изменению состава сточных вод и повышению концентрации токсичных компонентов.

В связи с этим перспективным представляется использование биосорбционных процессов для очистки сточных вод гальванических производств. Сущность биосорбции заключается в объединении во времени и пространстве сорбции загрязнений из сточных вод сорбентом и биохимического потребления компонентов сточных вод микроорганизмами, развивающимися на поверхности сорбента. При этом не исключается возможность биорегенерации сорбента. Активированные угли значительно снижают нагрузку на активную биомассу.

В качестве сорбента можно использовать гранулированный активный уголь (ГАУ) марки СКТ. Обработку стоков с шестивалентным хромом проводят в анаэробных условиях.

Учитывая высокую поглотительную способность ГАУ по отношению к шестивалентному хрому, можно сделать вывод о снижении токсичности влияния хроматов на активный ил при совместном использовании сорбционного и биологического процессов. Применение биосорбции значительно сокращает время очистки (в 4,0-4,9 раза) по сравнению с биологической очисткой при той же концентрации шестивалентного хрома.

Очистка сточных вод от шестивалентного хрома с помощью экстракции и мембранной технологии не нашла широкого применения в связи с периодичностью и высокой трудоемкостью проведения операций [70].

**Биологический способ очистки сточных вод аэротенками**

Биологическая очистка сточных вод кожевенной и меховой промышленности проводится совместно с очисткой бытовых сточных вод или раздельно. При раздельной очистке важно сохранить усредненный состав сточных вод и поддерживать рН<11, в противном случае сточные воды необходимо нейтрализовать.

Для биологической очистки сточных вод используют микроорганизмы, которые минерализуют растворимые органические вещества. Конечными продуктами аэробного разложения являются углекислый газ, вода и микробиальные клетки [18].

Сообщество микроорганизмов представлено одними бактериями в том случае, если очистку проводят в анаэробных условиях (в отсутствии растворенного в воде кислорода) или при слишком неблагоприятном уровне питания, который представляет собой отношение количества органических веществ к числу микроорганизмов. Неблагоприятным уровнем питания может оказаться, например, слишком высокое соотношение количеств подаваемых на очистку загрязнений и биомассы микроорганизмов. Если очистку проводят в анаэробных условиях (в присутствии растворенного кислорода), то при благоприятной обстановке в сообществе микроорганизмов развиваются простейшие, представленные cреди бактерий в очистных сооружениях сосуществуют гетеротрофы и автотрофы, причем преимущественное развитие та или иная группа получает в зависимости от условий работы системы. Эти две группы бактерий различаются по своему отношению к источнику углеродного питания. Гетеротрофы используют в качестве источника углерода готовые органические вещества и перерабатывают их для получения энергии и биосинтеза клетки. Автотрофные организмы потребляют для синтеза клетки неорганический углерод, а энергию получают за счет фото синтеза, используя энергию света, либо хемосинтеза путем окисления некоторых неорганических соединений (например, аммиака, нитритов, солей двухвалентного железа, сероводорода, элементарной серы и др.) [71].

Основными сооружениями для биологической очистки городских и многих промышленных сточных являются чаше всего аэротенки.

Аэротенки - сооружения, в которых процесс изъятия органических загрязнений осуществляется микроорганизмами. В процессе симбиоза микроорганизмов образуются хлопья активного ила. Размер этих хлопьев составляет в большинстве случаев 1 - 4 мм, но встречаются отклонения в большую или меньшую сторону. Процесс хлопьеобразования до конца не изучен, существует несколько теорий - действие внеклеточных биополимеров, заряд отдельных микроорганизмов активного ила. Очевидно и неоспоримо одно - симбиоз хлопьев активного ила обусловливает процесс автоселекции. При этом отбор микроорганизмов в жесткой конкурентной борьбе происходит из обитателей очищаемой сточной жидкости и окружающей среды (воздуха, поступающего на аэрацию, пыли и осадков непосредственно на месте очистки и т.д.).

Биологическая очистка происходит непосредственно в ходе продвижения смеси активного ила и сточной жидкости по коридору аэротенка и включает два процесса - деструкцию и трансформацию органического загрязнения микроорганизмами и биосорбцию загрязнения с образованием хлопьев активного ила. Причем сорбируются не только органические загрязнения, но и минеральные (например, красители соли металлов, радиоактивные частицы и т.п.). Оба процесса изъятия загрязнений из сточной жидкости происходят параллельно, какой из них доминирующий, не доказано [72].

Для устранения недостатков в работе аэротенка были предложены так называемые ячеечные аэротенки. Принцип их работы заключается в том, что очистка происходит стадиями или этапами в определенном объеме (ячейке), причем каждая ячейка имеет свой узел выделения приросшей биомассы и свою систему циркуляции активного ила. Сточная жидкость, перетекая из ячейки в ячейку, меняет свои свойства (становится чище), и активный ил также меняет свои свойства вследствие процесса автоселекции. В результате большего соответствия составов активного ила и субстрата очистка становится лучше и стабильнее. Развитие этих аэротенков сдерживается сложностью и дороговизной конструкции и неудобством эксплуатации [73].

**Биологический способ очистки сточных вод биологическими фильтрами**

Биофильтры с плоскостным загрузочным материалом. В настоящее время проектируются в основном биофильтры с плоскостным (регулярным и засыпным) загрузочным материалом, площадь удельной поверхности которого (поверхность биообрастания) достигает 90 – 260 м²/м³, пористость 90 - 98 %. Биофильтр представляет собой легкое, павильонного типа сооружение, находящееся на поверхности земли (не требуются земляные работы при строительстве), т.е. возможен быстрый монтаж биофильтра на площадке очистных сооружений из заводских деталей. Процесс изъятия органических загрязнений из сточных вод осуществляется в биофильтрах, так же как и в аэротенках при контакте очищаемой сточной жидкости с активной биомассой. Однако активная биомасса биофильтра представляет собой совсем другую структуру - биологическую пленку. Следует отметить, что видовой состав биопленки гораздо богаче, что отмечено многими отечественными и зарубежными исследователями. Это, несомненно, повышает эффективность и стабильность очистки сточных вод. Кроме того, количество активной биопленки на единицу объема биофильтра в 25 - 50 раз больше даже для биофильтров с объемным загрузочным материалом, а для биофильтров с плоскостной загрузкой рабочей биомассы - в сотни раз больше, чем в аэротенках.

В биофильтрах с плоскостным загрузочным материалом не только не происходит заиления верхнего слоя загрузки, как это было в биофильтрах с объемной загрузкой, но на них можно подавать и высококонцентрированные производственные сточные воды без предварительного отстаивания. По данным МИСИ-МГСУ, заиления не наблюдалось при подаче загрязнений, определяемых по БПКполн до 30 кг/м³ загрузочного материала в сутки, и количестве взвешенных веществ в очищаемой жидкости 1500 мг/л. Это объясняется тем, что удельная поверхность плоскостного загрузочного материала достигает 90 - 300 м²/м³ и в процессе эксплуатации работает полностью. Удельная поверхность объемной загрузки из гравия, щебня, керамзита составляет 50 - 60 м²/м³. В объемном загрузочном материале эффективная (рабочая) поверхность снижается в несколько раз в результате соприкосновения поверхности фракций. Пористость (свободный объем) плоскостных загрузочных материалов достигает 90 - 99 % и ее снижение на 15 - 20 % вследствие развития биообрастания не влияет на процессы естественной вентиляции загрузочного материала, как это происходит в биофильтрах с объемным материалом, где начальная пористость составляет всего 45 - 50% [74].

Основным преимуществом биофильтров по сравнению с аэротенками является естественное соответствие качества питательных веществ (загрязнений сточных вод) качеству потребителей (микроорганизмов биопленки). Качество субстрата обусловливает формирование биоценоза по ходу потока и создание оптимальных условий для очистки сточных вод. При эксплуатации не возникают такие трудности, как вспухание активного ила, пенообразование, вынос активного ила из сооружения.

Выносимая из биофильтра отработанная биопленка обладает лучшими седиментационными свойствами, чем активный ил аэротенка. Это позволяет сократить время отстаивания во вторичных отстойниках, и, следовательно, их объем.

Влажность биопленки из вторичного отстойника 95 - 96%, а активного ила 99- 99,5 %. следовательно, объем биопленки в 5-10 раз меньше, что позволяет ее экономить и отказаться от илоуплотнителей.

Большое значение имеет высота слоя плоскостного загрузочного материала в биофильтре. По данным зарубежных исследователей, увеличение слоя загрузочного материала с 3 до 6 м позволит вдвое сократить объем загрузочного материала при одинаковом эффекте очистки [75].

Необходимо отметить малую энергоемкость биофильтров с плоскостным загрузочным материалом, электроэнергия затрачивается только на подъем воды в водораспределительную систему.

В связи с большой пористостью плоскостного загрузочного материала возможно переохлаждение очищаемой сточной жидкости, что отрицательно сказывается на работе биофильтра. Однако, как показал опыт эксплуатации биофильтров с плоскостным загрузочным материалом в Канаде, ограничение поступления холодного воздуха в вентиляционные окна биофильтра, расположенного непосредственно на открытом воздухе, предохраняет очищаемую сточную жидкость от переохлаждения. По мнению канадских ученых [76], для проведения аэробного процесса в биофильтре достаточно поступления воздуха в количестве 20 м³/ч на 1 м² площади горизонтального сечения биофильтра. Поступление воздуха в вентиляционные окна биофильтра можно регулировать с помощью жалюзийных решеток, шиберов и других приспособлений. В ходе долгосрочных наблюдений установлено, что при наружных температурах воздуха от -30 до -40 °С снижение температуры очищенной сточной жидкости составляло всего 1 - 2 °С при начальной температуре очищаемой воды 10°С.

Единственным параметром, определяющим эффект очистки сточных вод по органическим загрязнениям, в биофильтре является нагрузка по БПК на единицу поверхности биообрастания в единицу времени - г БПК5/м² в сутки. По данным исследования МИСИ-МГСУ за долгосрочный период сточных вод различного происхождения и данным различных отечественных и зарубежных исследователей получена графическая зависимость и расчетная формула. Кратко, при нагрузках примерно: 5 г БПК5/м² в сутки эффект очистки составляет 95 %; 20 г БПК5/м² в сутки - 80 %; 80 г БПК5/м² в сутки - 50 %; далее по мере возрастания нагрузки по загрязнениям эффект очистки снижается очень медленно, достигая при нагрузках 140 - 240 г БПК5/м² в сутки постоянного уровня примерно 42 - 43 %. При больших нагрузках, к сожалению, провести исследования не удалось, а данные других исследователей не установлены.

Из проведенных исследований, очевидно, что биофильтры с плоскостным загрузочным материалом наиболее эффективны для грубой (предварительной) очистки сточных вод. При очистке сточных вод в несколько ступеней значительно сокращается требуемый объем загрузочного материала по сравнению с одноступенчатой схемой. Грамотное проектирование очистных сооружений с плоскостными биофильтрами позволяет значительно сократить, земельные площади, капитальные и эксплуатационные затраты.

Единственным недостатком при эксплуатации очистных станций биофильтрации (запроектированных по одноступенчатой схеме очистки) является сложность достижения необходимого эффекта очистки (при расчете станций на полную очистку) при изменении расчетного количества или качества сточных вод. Поскольку, как уже говорилось выше, нагрузку по органическим загрязнениям на единицу поверхности биообрастания, определяющую эффект очистки, можно регулировать только путем варьирования гидравлической нагрузки, которая может изменяться в узких оптимальных пределах.

Для устранения или минимизации недостатков описанных выше аэротенков и биофильтров были разработаны некоторые гибридные сооружения, например затопленные биофильтры, дисковые или погружные биофильтры, аэротенки с наполнителем в виде блочного, плавающего, ершового (нитевого) инертного материала - носителя активной дополнительной биомассы и др.[77].

Возможен и другой технический прием для достижения соответствия составов сточной воды и активного ила и возможно даже для исключения регенерации и циркуляции возвратного активного ила в системе. Этот прием заключается в размещении в секциях аэротенка биологически инертного материала в качестве носителя прикрепленной биомассы. Это позволит не только добиться соответствия составов вследствие процессов автоселекции комплекса субстрат - активный ил, но и снизить потребление электроэнергии в результате отказа от рециркуляции, регенерации и некоторого снижения интенсивности аэрации. Также прикрепленный биоценоз позволит облегчить проблему вспухающего активного ила при резких колебаниях состава сточной жидкости и проблему наращивания необходимой концентрации активного ила на слабоконцентрированной сточной воде.

К недостаткам аэротенков можно отнести ценообразование на очистных сооружениях, принимающих сточные воды с высоким содержанием СПАВ или белков, отгонка в атмосферу летучей органики и микроорганизмов [78].

Существует несколько технологических способов активации, от которых зависят конструкционные особенности активирующих резервуаров. Воздух подается в активаторы компрессором при тонком распылении воздушных пузырьков во всем объеме или же через поверхность воды механическим путем. Воздух перемешивает содержимое активирующих резервуаров, при этом кислород растворяется и создает аэрирующую среду для микроорганизмов активного ила. Расход воздуха зависит от эффективности очистки, концентрации активного ила и его биохимической активности. Для сточных вод кожевенной и меховой промышленности он составляет 30 мг воздуха на 1 м³ воды. При наличии пены перед биологической очисткой необходимо удалить танниды или же добавить пеногасители [79].

На предприятиях обычно образуются несколько потоков сточных вод, загрязненных различными компонентами, которые, смешиваясь, могут образовывать опасные химические соединения.

Для очистки локальных (цеховых) потоков сточных вод предприятий любого профиля можно использовать модульно-кассетные биофильтры.

В зависимости от состава сточных вод биофильтр может трансформироваться. В корпусе, выведенном из рабочего состояния по технологическим показаниям, производится легкая замена фильтрующего материала без остановки процесса очистки.

Биологическая пленка на загрузочном материале корпуса, выведенного из рабочего режима, может служить резервом адаптированной биопленки, которая вводится в работу по аналитическим и технологическим показателям очистки.

Благодаря пространству между корпусами обеспечивается интенсивный доступ кислорода воздуха к загрузке снизу, что способствует эффективному окислению загрязнений по всему объему. Отсутствие принудительной системы аэрации и рециклинга удешевляет процесс очистки.

Оптимальная высота загрузки предотвращает нежелательный процесс заиливания, что увеличивает время работы биофильтра, исключает трудоемкий процесс замены и подбора загрузочного материала по вышеуказанной причине.

Эффективная аэрация и достаточность питательного субстрата (загрязнений) в сточных водах приводит к нарастанию активной массы биопленки на загрузке во всех корпусах. В биофильтре предлагаемой модели отсутствуют зоны развития анаэробных микроорганизмов, отравляющих продуктами своей жизнедеятельности аэробную микрофлору, т.е. протекают только аэробные процессы окисления.

Основное преимущество модульно-кассетного биофильтра заключается в том, что после прохождения воды через загрузку очередного корпуса степень ее очистки повышается.

Увеличение числа корпусов приводит к кратному увеличению активной площади биофильтрации, а, следовательно, к интенсификации процесса очистки.

Экспериментальные данные подтверждают универсальность биологической очистки на модульно-кассетном биофильтре сточной воды с повышенной концентрацией органических загрязнений без предварительного разбавления. Благодаря регулированию процессов ввода и вывода корпусов появляется возможность управлять режимами нагрузки по массе загрязнений (БПК) и объему сточных вод на единицу массы биопленки, предотвращая вынос ее избыточной массы и проскок неокисленных загрязнений.

Корпусная структура биофильтра позволяет комбинировать и совмещать различные методы очистки: механические и биохимические, адсорбцию и биосорбцию, физико-химические, доочистку на мелкопористом материале.

Предлагаемый биофильтр можно применять для локальной очистки производственных стоков любого состава перед сбросом их в канализацию или повторным использованием в технологическом процессе. [80]

**Биологический способ очистки сточных вод активным илом**

Эффективность очистки активным илом зависит от морфологии хлопьев, их величины, формы и поверхности, от химического и микробиологического состава этой гетерогенной культуры. Характерной особенностью активного ила является биохимическая активность.

При активации основными процессами являются биохимическое разложение и удаление органических веществ из сточных вод. Поэтому эффективность активации можно оценивать на основе кинетики удаления органических веществ. Кроме биохимических процессов, на активном иле протекают также процессы адсорбции, которые зависят от свойств поверхности ила и состава сточных вод. На эффективность очистки также влияют коагулирующие свойства активного ила. Важным свойством активного ила является биофлокуляция гетерогенной культуры. Развитие и интенсивное использование активации приведет, вероятно, к использованию технических монокультур для получения активного ила [81].

Активный ил возникает самопроизвольно при аэрации. Его оптимальное количество зависит от способа аэрации, вида загрязнения сточной воды и конструкционных особенностей активирующих резервуаров. За расчетную принимается концентрация 2—6 г/л, поэтому из аэрируемой системы необходимо удалять избыточный ил, а его необходимую концентрацию постоянно поддерживать. Сточные воды из аэрационной системы вместе с активным илом подают в отстойники и после осветления спускают в водоем.

Биологическую очистку сточных вод можно производить в окислительных канавах, представляющих собой пруды в виде трека с одним или несколькими вращающимися поверхностными аэраторами. Окислительная канава легко эксплуатируется; расходы на ее строительство и эксплуатацию небольшие. По эффективности этот способ очистки можно отнести к процессам, основанным на использовании активного ила и аэрированных прудов [82].

**Комбинированная технологическая схема очистки сточных вод**

Технология предназначена для очистки сточных вод кожевенных и меховых предприятий, основными загрязнителями которых являются сульфиды, хром (Ш) и хром (VI), СПАВ, жиры и другие органические загрязнения, а также взвесь минерального и органического происхождения. Технология основана на использовании механических, физико-химических и биологических методов. Удаление токсичных и взвешенных веществ обеспечивается использованием минеральных и органических коагулянтов, получаемых на месте использования по специально разработанной технологии. В качестве минерального коагулянта используется сернокислое железо (электрогенерированный железосодержащий коагулянт). В качестве органического реагента используются высокомолекулярные органические соединения. Трудноокисляемые органические соединения удаляются в результате биологической доочистки в биореакторе с инертной загрузкой. При применении разработанной технологии гарантируется достижение следующих показателей по степени очистки сточных вод: ХПК - 90-95 %, БПК5 - 85-90 %, взвешенные вещества - 95-98 %, соединения хрома (Ш), сульфиды, фенолы - 99,5-99,9 %, аммонийный азот - 85-88 %. Объем образующегося осадка после обезвоживания составляет до 5 % от объема обработанной воды. Комбинирование биологических и физико-химических методов позволяет повысить качество очищенной воды до норм ПДК и в 2-3 раза снизить количество реагентов на стадии физико-химической очистки. Гарантируется отсутствие вторичного загрязнения очищенных сточных вод [83].

Биологическая очистка имеет ряд важных преимуществ перед другими методами. Микроорганизмы осуществляют полную деструкцию загрязнения до газообразных продуктов и воды, обеспечивая тем самым круговорот элементов в природе. Таким образом, при биологической очистке в отличие от других способов не происходит концентрации загрязнении или перевода их в другую форму. В то же время биологические методы наиболее экономичны, так как за исключением основных капиталовложений почти не требуют расходов во время эксплуатации сооружений, а главный действующий компонент биологической очистки – активный ил самовоспроизводится [84].

**Заключение**

Рассмотрены структура жировых веществ, современные способы удаления и утилизации, а также современные методы обезжиривания. Наиболее эффективным методом очистки сточных вод, содержащих жировые вещества, является биологический способ, который применяется для удаления жиров с помощью микроорганизмов-деструкторов.

Изучены морфолого-культуральные и физиологические свойства исследуемых культур микроорганизмов. Рассмотрено влияние внешних факторов на динамику роста и развития микроорганизмов. Проведены скриннинговые исследования для культур, продуцирующих суммарный продукт жизнедеятельности микроорганизмов с максимальной липолитической и минимальной протеолитической активностями.

Показана возможность применения микроорганизмов, обладающих липолитической активностью для проведения процесса обезжиривания меховой овчины, шкурок енота и белки.

Установлено, что ферментативное проведение процесса приводит к получению обезжиренного полуфабриката.

Разработаны маточные растворы, способствующие получению обезжиренного полуфабриката с минимальными затратами. Наиболее оптимальным является вариант, в котором при проведении процесса используется рабочая ванна с 100% расходом бактериальной суспензии от объема рабочего раствора, при продолжительности культивирования 24 часа. Применение данной бактериальной суспензии обеспечило оптимальное удаление жировых веществ с поверхности кожевой ткани и волосяного покрова меховой овчины, соответствующей ГОСТ 4661-76.

Замена типовой методики проведения процесса обезжиривания позволяет значительно сократить расход химических материалов при проведении процесса и снизить токсичность образуемых сточных вод.

**Список использованных источников информации**

1 Тютюнников Б.Н. Химия жиров. — М.: Колос, 1992. — 376 с.

2 Филиппович Ю.Б. Основы биохимии. – 4-е изд., перераб. и доп. – М.: Агар, 1999. – 512 с.

3 Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф. Биологическая химия. - М.: Медицина, 1998. –704 с.

4 Верболович П.А. и др. Лекции по отдельным разделам биологической химии / П.А.Верболович, Н.Р.Аблаев, М.И. Гуськов – Алма-Ата: Наука, 1985. - 156 с.

5 Воюцкий С.С. Курс коллоидной химии.– М.: Химия, 1987.– 516 с.

6 Беззубов Л.П. Химия жиров. — М.: Пищепромиздат,1956. — 227 с.

7 Егоров Н.С. и др. Промышленная микробиология / Н.С. Егоров, Б.М.Безбородов, И.Н. Блохина. — М.: Высш. шк., 1989. — 688 с.: ил.

8 Асонов Н.Р. Микробиология. — М.: Агропромиздат, 1982. — 351 с.

9 Нецепляев С.В., Панкратов А.Я. Лабораторный практикум по микробиологии пищевых продуктов животного происхождения. — М.: Агропромиздат, 1990. — 223 с.

10 Кучеренко Н.Е., Васильев А.Н. Липиды. – Киев: Вища шк., 1985. – 247с.

11 Гриневич А.Г., Босенко А.М. Техническая микробиология. – Минск: Высш. шк, 1986. – 168с.

12 Мусил Я., Новакова О. Современная биохимия в схемах. – М.: Мир, 1981.-216с.

13 Кунц К. Возрастные особенности липидного состава // Биохимия. – 1999.- т.64 - вып.5.- С. 652-655.

14 Безбородов А.М. Биотехнология продуктов микробного синтеза. – М.: Агропромиздат, 1991. – 238с.

15 Рубан Е.Л. Микробные липиды и липазы. - М.: Наука, 1977. – 216 с

16 Дженсон Р., Брокерхоф Х. Липолитические ферменты. - М.: Мир, 1978.- 396 с.

17 Шестакова И.С. и др. Ферменты в кожевенном и меховом производстве / И.С.Шестакова, Л.В.Моисеева, Т.Ф. Миронова. - М.: Легпромбытиздат, 1990. – 128с.

18 Страхов И.П. и др. Химия и технология кожи и меха / И.П.Страхов, И.С.Шестакова, Д.А. Куциди. - М.: Легпромбытиздат, 1985. – 496 с.

19 Чернов Н.В. Технология кожи и меха. - М.: Гизлегпром, 1959. – 720с.

20 Лабораторный практикум по технологии ферментных препаратов. Учебное пособие для вузов/ И.М.Грачева, Ю.П.Грачев, М.С. Мосичев и др. – М.: Легкая и пищевая промышленность, 1982. – 240с.

21 Брагинский Л.П. Некоторые принципы классификации пресноводных экосистем по уровням токсической загрязненности // Гидробиологический журнал.- 1985.- т. 21.- №6.- С. 65-74.

22 О биотехнологическом методе обезжиривания мехового сырья / Дм.В.Шалбуев, В.С.Думнов, Е.Г.Инешина, В.Ж. Цыренов // Кожевенно – обувная промышленность. – 2003. - №5.- с. 31-32.

23 А.с. № 1002358 СССР. МКИ 4 С 14 С 1/08. Состав для обезжиривания меховых овчин / Я.А. Пурим, С.М.Бреслер, М.В. Савина / (СССР) – 3228159/28-12. Заявл. 29.12.80. Опубл. 07.03.83. Бюл. № 9.

24 А.с. № 1098955 СССР. МКИ 4 С 14 С 1/08. Состав для обезжиривания меховых овчин / Я.А. Пурим, Е.А. Королькова, Б.С.Григорьев / (СССР) – 3561148/18-12. Заявл. 03.03.83. Опубл. 23.06.84. Бюл. № 23.

25 А.с. № 1134598 СССР. МКИ 4 С 14 С 1/04. Способ мойки-обезжиривания меховых и шубных овчин / Л.А. Комиссарова, О.Д. Рохваргер, Ф.Х. Коганскене / (СССР) – 3529926/28-12. Заявл. 28.12.82. Опубл. 15.01.85. Бюл. № 2.

26 А.с. № 1410534 СССР. МКИ 4 С 14 С 1/08. Состав для обезжиривания меховых овчин / С.В. Чесунов, Л.Л.Щеголева, Б.С.Григорьев / (СССР) – 4187970/28-12. Заявл. 28.11.86.

27 Обезжиривающие составы на основе отходов производства олеиновой кислоты / А.В.Островская, И.Ш.Абдуллин, Г.Г.Лутфуллина, И.В. Безчвертная // Кожевенно – обувная промышленность. – 2000.- №5.- с. 43-45.

28 Рохваргер О.Д. Ферменты в меховом производстве. - М.:Легкая индустрия, 1977. – 224с.

29 Журавский В.А. и др. Совершенствование технологии производства мягких видов кож из свиного сырья / В.А. Журавский, Н.И.Денисенко, А.И. Поволоцкий // Кожевенно – обувная промышленность. – 1986.- №12.- с. 21-22.

30 А.с. № 927857 СССР. МКИ 4 С 14 С 1/08. Состав для обезжиривания свиного сырья / И.И.Микаэлян, Л.М.Меньшикова, А.А.Сакулина / (СССР) – 2908728/28-12. Заявл. 14.04.80. Опубл. 15.05.82. Бюл. № 18.

31 Валейкене В.А. и др. Исследование обезжиривания свиных шкур панкреатическими ферментными препаратами / В.А.Валейкене, А.А.Симанайтите, А.А. Скродянис // Кожевенно – обувная промышленность. – 1985.- №4.- с. 31-33.

32 А.с. № 644842 СССР. МКИ 4 С 14 С 1/08. Состав для обезжиривания коллагенсодержащего сырья / Б.Е.Чистяков, И.Т.Полковниченко, Г.Г.Балахонов / (СССР) – 2461622/28-12. Заявл. 21.02.77. Опубл. 30.01.79. Бюл. № 4.

33 А.с. № 2036971 СССР. МКИ 4 С 14 С 1/08. Средство для обезжиривания коллагенсодержащего сырья / П.С.Фахретдинов, В.С.Угрюмова, А.З.Равилов / (СССР) – 5006229/12. Заявл. 01.07.91. Опубл. 09.06.95. Бюл. № 16.

34 Особенности ферментативной отмоки-обезжиривания шкур угря / Е.М.Харчуткина, Е.П.Болдлвская, О.В.Дормидонтова, О.В. Васьянова // Кожевенно – обувная промышленность. – 2003.- №2.- с. 38-39.

35 Романенко В.И., Кузнецов С.И. Экология микроорганизмов пресных водоемов. – Л.: Наука, 1974. – 194 с.

36 Barlaz M.A., Ham R.K., Schaefer D.M. // Crit. Rev. Environ.Control. 1990. V.19. P.557-584

37 Фогорти В.М. Микробные ферменты и биотехнология. – М.: Наука, 1986. -218 с.

38 Листков Л.Л. Очистка сточных вод предприятий мясной промышленности в зарубежных странах. — М.: ЦНИИТЭ, 1978. — 37с.

39 Клименко Н.А., Панченко Н.П. Оценка качественного состава сточных вод // Текстильная промышленность. – 1991. - № 2. - С. 85 – 86.

40 Пальгунов Н.В., Абрамов А.Н. Очистка сточных вод мясоперерабатывающих заводов // Экология и промышленность России. – 2000. - №12. - С. 4-6.

41 Эндо Х. Современное состояние и перспективные проблемы промышленных сточных вод. — М.: Наука, 1985. — 37 с.

42 Кравцов А.С. Флотационные системы очистки сточных вод от масел и жиров // Масложировая промышленность. — 1995.- №5.- С. 14-16.

43 The Otelfinger aquaculture proekt: Recicling of nutrients from waste water in a temperate climate. 1002564, Германия, Staudenmann J, Jungeberberovic R, 2003.

44 Дамбиев Ц.Ц. Охрана окружающей среды на предприятиях мясоперерабатывающей промышленности за рубежом. — Улан-Удэ, ВСГТУ. —54 с.

45 Цыцыктуева Л.А. Охрана вод в Байкальском регионе: проблемы, подходы, теория и практика. - У-У.: БНЦ СО РАН, 2001. – 117 с.

46 Справочник по очистке природных и сточных вод / Л.П.Пааль, Я.Я.Кору, Х.А. Мельдер и др. — М.: Высшая школа, 1994. — 336 с.

47 Effekts of n-hexadecane and PM-100 clay on trichloroethylene degradation by Burkholderia cepatica. French W.T., Brown L.R. № 031185, 2002

48 Reinigung fetthaltiger Abwasser der Frostfischindustrie nut thermophilen Mikroorganismen. Reimann J, Gotsche A. Chem-Ind-Techn, 2002, №5, s634

49Grease oil separator and digester, № 0117273.3, 2003, Carr W.A.

50 Кузнецова Г.Н. Новый эффективный реагент для очистки сточных вод // Мясная индустрия. — 1997. - №2. - С.17-18.

51 Гвоздяк П.И. Возможности и перспективы биологической очистки воды. — Киев: ИКХихв, 1998. — 138 с.

52 Душин М.Б., Григорьева В.И. Методы очистки сточных вод кожевенных заводов. — М.: Лёгкая инд-ия, 1979. — 95 с.

53 Шалбуев Дм.В. Управление качеством окружающей среды на кожевенно-меховых предприятиях. - У-У.: ВСГТУ, 2004. – 122 с.

54 Шапиро А.Е., Хренников Н.С. Техника безопасности в кожевенном производстве. - М.: Гизлегпром, 1983.

55 Захаров Л.Н. Техника безопасности в химической лаборатории. – М.: Химия, 1985. – 182 с.

56 3 Макаров Г.В. и др. Охрана труда в химической промышленности. / Г.В.Макаров, М.А.Стрельчук, В.Г. Кулешов– М.: Химия, 1987. – 568 с.

57 Охрана труда в химической промышленности / П.И.Соловьев, М.А.Стрельчук, Н.В. Ермилов, Б.Л. Канер– М.: Химия, 1989. – 528 с.

58 Березин В.М. Правила безопасной работы с химическими веществами в высших и средних специальных заведениях. – М.: Химия, 1989. – 62 с.

59 Охрана труда и техника безопасности в химической промышленности. Сборник нормативных материалов. – М.: Химия, 1984. – 504 с.

60 Гусев А.Г. Охрана вод рыбохозяйственных водоем от загрязнении. – М.: Пищевая промышленность, 1975.- 367 с.

61 Охрана труда и техника безопасности в химической промышленности. Сборник нормативных материалов. – М.: Химия, 1974. – 501 с.

62 Дроздов М.С., Материнская Н.П. Практикум по биологической химии. – М.: Высшая школа, 1987. – 308 с.

63 Инешина Е.Г. и др. Методические указания для выполнения лабораторных работ по курсу микробиология / Е.Г.Инешина, Л.Ю. Прудова, О.Ю. Фалилеева– Улан-Удэ: ВСГТУ, 1997. – 78 с.

64 Макаров Г.В. Охрана труда в химической промышленности. - М.: Химия, 1977. – 128 с.

65 Ласков Ю.М. и др. Очистка сточных вод предприятий кожевенной и меховой промышленности / Ю.М.Ласков, Т.Г.Федоровская, Г.Н. Жмакова - М.: Легкая и пищевая промышленность, 1984. – 166с.

66 Очистка сточных вод предприятий меховой промышленности / М.Р.Сизых, Д.Б. Жалсанова, А.А.Батоева, А.А. Рязанцев // Экология и промышленность России. – 2004. - № 4. С. 22-25.

67 Рязанцев А.А., Ивчатов А.Л. Биологическая очистка сточных вод // Экология и промышленность Росси.- 2003. - № 1.- С. 32-34.

68 Reinigung fetthaltiger Abwasser der Frostfischindustrie nut thermophilen Mikroorganismen. Reimann J, Gotsche A. Chem-Ind-Techn, 2002, №5, s634

69 Grease oil separator and digester, № 0117273.3, 2003, Carr W.A.

70 Зубарева Г.И. и др. Способы очистки сточных вод от соединений хрома (VI) / Г.И.Зубарева, М.Н.Филипьева, М.И. Дегтев // Экология и промышленность Росси. – 2005. - № 2. С. 31-33.

71 Лурье, А.И.Рыбникова Химический анализ производственных сточных вод. - М.: Наука, 1974. – 325с.

72 Ивчатов А.Л., Гляденов С.Н. Еще раз о биологической очистке сточных вод // Экология и промышленность России. - 2003. - № 4.- С. 37-40.

73 Комплексное использование и охрана водных ресурсов / Под ред. О.А. Юшманова. - М.: Агропромиздат, 1985.

74 Жуков А.И. и др. Методы очистки производственных сточных вод. / А.И. Жуков, И.Л.Монгайт, И.Д. Родзиллер - М.: Стройиздат, 1986

75 Кореневский В. И. Фильтры для очистки сточных вод // ЭКиП: Экология и промышленность России. – 2002. - № 10. – С. 6-8.

76 Повышение эффективности очистки сточных вод кожевенного и мехового производства // Экология и промышленность России. – 2002. - № 10. – С. 36-37

77 Возная Н.Ф. Химия воды и микробиология. - М: Высшая школа, 1979.

78 Жмаков Г.Н. Очистка сточных вод кожевенных заводов // Кожевенно-обувная промышленность. – 1992. - №4. – С. 22-26.

79 Кудряшова Г.Н., Жмаков Г.Н. Совершенствование схем очистки сточных вод мехового производства // Кожевенно-обувная промышленность. – 1987. - №9. – С. 10-13.

80 Журавлева Л.Л. Очистка сточных вод химических производств на модульно-кассетных биофильтрах // Экология и промышленность России. - № 5. -2004. - С.20-22

81 Туровский И.С. Обработка осадков сточных вод - М.: Стройиздат.- 1984.

82 Соколов В.Н. Охрана производственных сточных вод и утилизация осадков.-М.:Стройиздат,1992 83 Жмаков Г.Н., Л.А.Саблий Комбинированная технологическая схема очистки сточных вод // Кожевенно-обувная промышленность. - 1992.- №4. –С. 22-26.

84 Справочник по очистке природных и сточных вод / Л.П.Пааль, Я.Я.Кору, Х.А. Мельдер и др. — М.: Высшая школа, 1994.- 336 с.

**Приложение Б**

«Утверждаю»

Директор УНПК «Эком»

\_\_\_\_\_\_\_\_\_Советкин Н.В.

«\_\_\_» июнь 2005г.

АКТ

о полупроизводственных испытаниях проведения биотехнологических процессов обезжиривания и пикелевания шкурок белки

Комиссия в составе: представителей УНПК «ЭКОМ» зав.производством Евсиковой О.И., аппаратчиков Маркеева Д.А., Мясникова А.И. – с одной стороны и преподавателей кафедр «Технология кожи, меха и товароведение непродовольственных товаров» и «Биотехнология» к.т.н. доц. Шалбуева Дм.В., к.б.н., доц. Инешиной Е.Г. и студентов 110-1 группы Бадмаевой А.Н и Забеевой СВ. составили настоящий акт о проведении полупроизводственных испытаний процессов биотехнологического обезжиривания и пикелевания шкурок белки

Для проведения испытаний были взяты шкурки белки пресно-сухого метода консервирования после проведения процесса отмоки. Отмока и механические операции, включая стрижку и мездрение, проводились согласно типовой методике обработки.

Раствор для обезжиривания готовили следующим образом. На первом этапе была приготовлена синтетическая среда с целью приготовления бактериальной суспензии. Культивирование проводили в термостате марки «ТС-80М-2» в течение 24 часов, при температуре 38±0,50С и периодическим механическим воздействием, осуществляемым на встряхивателе «Shaker-Type 357» со скоростью 250 об/мин, амплитудой 6. В таблице Б1 представлен состав маточного раствора.

Таблица Б1 – Основные параметры маточного раствора

|  |  |
| --- | --- |
| Наименование параметра | Количественное выражение |
| Количество вводимой биомассы, кл/см3 | 105 - 107 |
| Продолжительность культивирования, час | 24 |
| Липолитическая активность, ед/г | 4,53 |
| Протеолитическая активность, ед/г | 2,80 |
| Кислотность, г/дм3 | 1,5 |
| Концентрация суммарного продукта жизнедеятельности микроорганизмов, г/дм3 | 0,05 |
| Концентрация СПАВ, г/дм3 | 4 |

В обезжиривающую ванну наливали бактериальную суспензию, добавляли 50% маточного раствора и СПАВ неионогенный Превоцелл W-OF-7 – 4 г/дм3, затем помещали шкурки белки. Процесс проводили при температуре 400С с переменным механическим воздействием в течение 45 минут. После обезжиривания проводили промывку проточной водой при температуре 40-42 0С в течение 30 минут. Затем проводили отжим по волосу на центрифуге в течение 60 секунд.

По окончании обезжиривания провели органолептическую оценку качества удаления жировых веществ с поверхности волосяного покрова и из кожевой ткани.

В дальнейшем был проведен процесс пикелевания кисломолочными бактериями, выделенными из кефирной грибковой кисломолочной композиции и курунговой кисломолочной композиции, культивируемых на обезжиренном молоке или на молочной сыворотке. Перед проведением процесса пикелевания была достигнута высокая кислотность (3500Т) и высокая вязкость (2,6010×103) исследуемых композиций. Процесс проводили следующим образом: на выровненную поверхность образцов шкурок белки влажностью 65% наносили молочнокислый раствор с расходом 25 см3 . Кисломолочную композицию наносили при помощи деревянной лопаточки по всей площади шкурок белки. После нанесения кисломолочной композиции шкурки белки покрывали полиэтиленовым мешочком и помещали под пресс масса которого равнялась 7 кг. на 1 дм2. Продолжительность пикелевания составила 24 часа. Температура сваривания после процесса пикелевания составила 480С. Дубление и дальнейшие процессы проводили по типовой методике. Результаты представлены в таблице Б2.

Таблица Б2 – Общий химический анализ кожевой ткани

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Показатель | ГОСТ 12780-67 | Опытный вариант |
| Массовая доля влаги, не более % | 14 | 11±1 |
| Массовая доля жира в кожевой ткани, % | 20,0 | 18±1 |
| Нагрузка при разрыве поперечного участка целой шкурки, Н | 50 | 53±1 |
| Температура сваривания кожевой ткани, не ниже, 0С | 55 | 62±1 |
| рН водной вытяжки | Не менее 4,0 | 6,0±1 |

Из данных, представленных в таблице Б1, видно, что содержание основных показателей удовлетворяет требованиям ГОСТ 12780-67 «Шкурки белки выделанные».

Таким образом, предлагаемый вариант проведения процесса обезжиривания позволяет удалить достаточное количество жировых веществ с поверхности волосяного покрова и кожевой ткани, при значительном сокращении расходов СПАВ (с 6 до 4 г/дм3), а также в отсутствии карбоната натрия и формальдегида в составе обезжиривающей ванны. При пикелевании с использованием кисломолочных бактерий, выделенных из кефирной грибковой кисломолочной композиции и курунговой кисломолочной композиции, культивируемых на обезжиренном молоке или на молочной сыворотке отсутствуют сточные воды, содержащие минеральные примеси и кислоты различной химической природы, а качество полученного полуфабриката отвечает требованиям ГОСТ 12780-67 «Шкурки белки выделанные».

Советкин Н.В. Шалбуев Дм.В.Евсикова О.И. Инешина Е.Г.

Маркеев Д.А. Бадмаева А.Н. Мясников А.И. Забеева С.В.

«Утверждаю»

Директор УНПК «Эком»

\_\_\_\_\_\_\_\_\_Советкин Н.В.

«\_\_\_» июнь 2005г.

АКТ

о полупроизводственных испытаниях проведения биотехнологических процессов обезжиривания и пикелевания шкурок енотовидной собаки

Комиссия в составе: представителей УНПК «ЭКОМ» зав.производством Евсиковой О.И., аппаратчиков Маркеева Д.А., Мясникова А.И. – с одной стороны и преподавателей кафедр «Технология кожи, меха и товароведение непродовольственных товаров» и «Биотехнология» к.т.н. доц. Шалбуева Дм.В., к.б.н., доц. Инешиной Е.Г. и студентов 110-1 группы Бадмаевой А.Н. и Забеевой С.В. составили настоящий акт о проведении полупроизводственных испытаний процессов биотехнологического обезжиривания и пикелевания шкурок енотовидной собаки

Для проведения испытаний были взяты шкурки енотовидной собаки пресно-сухого метода консервирования после проведения процесса отмоки. Отмока и механические операции и мездрение, проводились согласно типовой методике обработки.

Раствор для обезжиривания готовили следующим образом. На первом этапе была приготовлена синтетическая среда с целью приготовления бактериальной суспензии. Культивирование проводили в течение 24 часов, при температуре 38±0,50С и периодическим механическим воздействием, осуществляемым на встряхивателе «Shaker-Type 357» со скоростью 250 об/мин, амплитудой 6. В таблице Б3 представлен состав маточного раствора.

Таблица Б3 – Основные параметры маточного раствора

|  |  |
| --- | --- |
| Наименование параметра | Количественное выражение |
| Количество вводимой биомассы, кл/см3 | 105 - 107 |
| Продолжительность культивирования, час | 24 |
| Липолитическая активность, ед/г | 4,53 |
| Протеолитическая активность, ед/г | 2,80 |
| Кислотность, г/дм3 | 1,5 |
| Концентрация суммарного продукта жизнедеятельности микроорганизмов, г/дм3 | 0,05 |
| Концентрация СПАВ, г/дм3 | 4 |

В обезжиривающую ванну наливали бактериальную суспензию, добавляли 50% маточного раствора и СПАВ неионогенный Превоцелл W-OF-7 – 4 г/дм3, затем помещали шкурки белки. Процесс проводили при температуре 400С с переменным механическим воздействием в течение 45 минут. После обезжиривания проводили промывку проточной водой при температуре 40-42 0С в течение 30 минут. Затем проводили отжим по волосу на центрифуге в течение 60 секунд.

По окончании обезжиривания провели органолептическую оценку качества удаления жировых веществ с поверхности волосяного покрова и из кожевой ткани.

В дальнейшем был проведен процесс пикелевания кисломолочными бактериями, выделенными из кефирной грибковой кисломолочной композиции и курунговой кисломолочной композиции, культивируемых на обезжиренном молоке или на молочной сыворотке. Перед проведением процесса пикелевания была достигнута высокая кислотность (3500Т) и высокая вязкость (2,6010×103) исследуемых композиций. Процесс проводили следующим образом: на выровненную поверхность образцов шкурок белки влажностью 65% наносили молочнокислый раствор с расходом 250 см3 . Кисломолочную композицию наносили при помощи деревянной лопаточки по всей площади шкурок белки. После нанесения кисломолочной композиции шкурки белки покрывали полиэтиленовым мешочком и помещали под пресс масса которого равнялась 7 кг. на 1 дм2. Продолжительность пикелевания составила 24 часа. Температура сваривания после процесса пикелевания составила 480С. Дубление и дальнейшие процессы проводили по типовой методике. Результаты представлены в таблице Б4

Таблица Б4 – Общий химический анализ кожевой ткани

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Показатель | ГОСТ 11355-65 | Опытный вариант |
| Массовая доля влаги, не более % | 14,0 | 11,0±1 |
| Массовая доля жира в кожевой ткани, % | 25,0 | 24,0±1 |
| Массовая доля жира в волосном покрове, % | 2,0 | 1,9±1 |
| Температура сваривания кожевой ткани, не ниже, 0С | Не ниже 65 | 70±1 |
| рН водной вытяжки | 3,5-7,0 | 6,5±1 |

Из данных, представленных в таблице Б4, видно, что содержание основных показателей удовлетворяет требованиям ГОСТ 11355-65 «Шкурки енота выделанные натуральные или крашенные».

Таким образом, предлагаемый вариант проведения процесса обезжиривания позволяет удалить достаточное количество жировых веществ с поверхности волосяного покрова и кожевой ткани, при значительном сокращении расходов СПАВ (с 6 до 4 г/дм3), а также в отсутствии карбоната натрия и формальдегида в составе обезжиривающей ванны. При пикелевании с использованием кисломолочных бактерий, выделенных из кефирной грибковой кисломолочной композиции и курунговой кисломолочной композиции, культивируемых на обезжиренном молоке или на молочной сыворотке отсутствуют сточные воды, содержащие минеральные примеси и кислоты различной химической природы, а качество полученного полуфабриката отвечает требованиям ГОСТ 11355-65 «Шкурки енота выделанные натуральные или крашенные».

Советкин Н.В. Шалбуев Дм.В.Евсикова О.И. Инешина Е.Г.

Маркеев Д.А. Бадмаева А.Н. Мясников А.И. Забеева С.В.