ДИПЛОМНАЯ РАБОТА

"Выделение, изучение свойств микроорганизмов и их использование для выполнения подготовительных процессов переработки овчинно-мехового сырья"

**Введение**

В связи с производственной активностью увеличивается антропогенное воздействие на окружающую среду. Особо остро данный вопрос стоит в Байкальском регионе, вследствие этого требуется корреляция экономической деятельности предприятий с предполагаемым уровнем техногенного воздействия на окружающую среду. Снижение объемов и токсичности сточных вод достигается либо созданием современных методов очистки и утилизации, либо совершенствованием технологии. Наиболее оптимальным является последний способ, который позволяет при сохранении качественных параметров выпускаемой продукции значительно снизить уровень токсического загрязнения. Это можно достигнуть не только уменьшением расхода используемых ингредиентов в технологических процессах, но и замене высокотоксичных веществ на менее токсичные.

Основными загрязнителями на предприятиях меховой промышленности являются синтетические поверхностно-активные вещества (СПАВ). Данные ингредиенты широко применяются для удаления жировых веществ с поверхности волосяного покрова. Сточные воды, содержащие СПАВ, трудно поддаются биодеструкции и, попадая в водоемы вредно влияют на биоценоз и могут вызвать гибель высокоорганизованных организмов.

Решение данной проблемы возможно через внедрение экологически безопасных технологий, основанных на биотехнологических методах. Одним из способов, позволяющих сохранить качество мехового полуфабриката при снижении степени загрязнения сточных вод, является проведение совмещенного микробиологического и эмульсионного методов обезжиривания.

В связи с этим, целью данной работы являлось получение концентрированного ферментного препарата, изучение его свойств и проведение на его основе процесса обезжиривания меховой овчины.

**1. Литературный обзор. Механизм воздействия прокариотических микроорганизмов на спав и липазу**

Представители рода Pseudomonas настолько широко распространены в природе, что их можно назвать вездесущими. Такое распространение основано на способности усваивать самые разнообразные по природе соединения и расти в различных экологических условиях /1/.

Повсеместное распространение Pseudomonas в природе обеспечивается способностью этих микроорганизмов расти в широких диапазонах температур, при высоком гидростатическом давлении, выдерживать полное обезвоживание. Некоторые из представителей этого рода могут находиться в анаэробных условиях, другие осуществляют дыхание в присутсвии цианида. Двуокись углерода в повышенных количествах подавляет рост гетеротрофных псевдомонад, но служит источником углерода для автотрофных видов этого рода. Для роста разных видов Pseudomonas могут служить самы различные среды, начиная с дистиллированной воды до сложных сред, включающих вещества животоного и растительного происхождения и производные нефти. Среди Pseudomonas найдены виды с высокой осмофильностью и галофильностью. Далеко не все из известных видов Pseudomonas подробно исследованы. Физиолого-биохимическое изучение многих видов Pseudomonas, оставшихся пока вне поля зрения исследователей, несомненно даст много новых фактов о приспособляемости микроорганизмов к разнообразным условиям обитания /2/.

Псевдомонады способны расщеплять синтетические поверхностно-активные вещества (СПАВ). Легкость расщепления СПАВ, в частности алкил- и арилсульфатов, объясняется, по-видимому, тем, что в природных условиях в почве широко распространены холин-о-сульфат, который входит в состав клеток бактерий и используется ими как источник серы после расщепления сульфогидралазой. Также ПАВ очень сильно влияют на микроорганизмы /3/.

1**.1 Действие ПАВ на микроорганизмы**

Специфические свойства ПАВ, в первую очередь их способность к солюбилизации и образованию мицелл, обуславливает их активность этих соединений по отношению к различным биологическим объектам. Они могут действовать совместно с бактерицидами и при мицеллярных концентрациях инактивировать вещества путем их солюбилизации. Если рассматривать биологические мембраны как сложные двойные соли с гидрофобным ядром и гидрофильным окружением, то логично предположить, что молекулы ПАВ будут взаимодействовать с ними. В этом отношении микроорганизмы представляют собой уникальную модель, с помощью которой можно изучать действие ПАВ как на структурные компоненты клетки (клеточную стенку, мембраны), так и на протекание процессов обмена веществ /4/.

Исследование действия ПАВ на клетки микроорганизмов невозможно без достаточной информации о строении самого объекта. Наиболее удобной для понимания рассматриваемой проблемы представляется схема, предложенная в 1984 году австралийским ученым А. Виккеном. Она составлена с учетом присутствия в клеточных стенках бактерий соединений, обладающих амфифильными свойствами, т.е. наиболее вероятных «мишеней» для действия ПАВ /5/.

Гидрофильные компоненты бактериальных амфифилов являются обычно заряженными большими молекулами, что можно проиллюстрировать на примере липополисахаридов грамотрицательных (Гр-) бактерий и липотейхоевых кислот у грамположительных (Гр+). Клетки бактерий дифференцируют на грамположительные и грамотрицательные в зависимости от их способности или неспособности окрашиваться в темно-фиолетовый цвет при использовании метода, предложенного в 1884 г. Грамом. Эти свойства, в свою очередь, обусловлены особенностями строения клеточных стенок бактерий /6/.

Внутренняя часть бислоя внешней мембраны грамотрицательных бактерий содержит фосфолипиды (ФЛ), протеины (Пр), липополипротеины (Лпр), которые образуют ковалентное окружение пептидогликанового слоя, лежащего над плазматической мембраной. В верхней части внешнего мембранного бислоя находятся липополисахаридные молекулы – гладкие (ЛПС) и шероховатые (РЛПС), а также гаптенные (ЭОА) и иммуногенетические (ЭОА – РЛПС) формы. Плазматическая мембрана грамположительных бактерий представлена состоящей из протеинов (Пр), фосфолипидов (ФЛ), гликолипидов (ГЛ), в верхней части – из ацилированных липотейхоевых кислот (аЛТК), чьи гидрофильные полиглицерофосфатные цепи пронизывают матрикс клеточной стенки, выходя на поверхности бактериальной клетки. Молекулы так называемых «транзитных» ЛТК могут находиться только в верхнем слое клеточной стенки и обнаруживаются в составе выделяемых комплексов. Полисахариды (ПС) также выделяются в среду, где идентифицируют комплексы трех типов: М1 – состоящие из мембранных липидов; М2 – из аЛТК, белков ФЛ и ПС; М3 – из аЛТК и белков. Если же схематически изображать структуру приведенных выше амфифилов, где четко выделяются гидрофобные (заштрихованные) и гидрофильные (заряженные) части молекул, то станет очевидным общее структурное сходство природных амфифилов с синтетическими ПАВ. Более того, бактериальные амфифилы способны образовывать мицеллярные агрегаты аналогично ПАВ. Бактерии же различных групп существенно различаются своими амфифилами как вкачественном, так и в количественном отношениях. Не удивительно, что одно и то же ПАВ оказывает зачастую неадекватное воздействие на различные бактерии. Эффекты такого рода, по-видимому, являются причиной большого числа предполагаемых механизмов действия ПАВ на клетки микроорганизмов. Основными методами оценки действия ПАВ на бактерии, определяющими, в свою очередь, тот или иной гипотетический механизм, являются электронная микроскопия, идентификация и количественный анализ отдельных компонентов (макромолекул) клеточных стенок, мембран либо содержимого цитоплазмы.

Первые электронно-микроскопические исследования по изучению влияния детергентов на клеточные стенки бактерий проводились американскими учеными А. Митчелом (1947) и М. Солтоном (1951), которые показали, что детергенты способны дезинтегрировать бактериальную клеточную стенку. В настоящее время электронная микроскопия является единственным средством, дающим наиболее полное представление о событиях, происходящих при взаимодействии ПАВ с клеточной поверхностью /7/.

В качестве конкретного примера рассмотрим делящиеся клетки характерной формы, легко обнаруживаемые во всех препаратах. После выдерживания бактериальной суспензии в буферном растворе, содержащем тритон Х-100, наблюдается отторжение цитоплазматической мембраны от клеточной стенки. Это явление наблюдали ряд авторов при обработке клеток других грамположительных бактерий холатами, цетилтриметиламмонийбромидом, и, вероятно, оно типично для большинства ПАВ. К особенностям, характеризующим их воздействие на бактериальную клетку, относится также изменение лучепропускаемости цитоплазмы: она становится темной, внутриклеточные структуры – неразличимыми. В дальнейшем наступает разрыв клеточной стенки и высвобождение цитоплазмы в окружающую среду. Заметное искажение поверхности цитоплазматической мембраны свидетельствует о взаимодействии ПАВ с мембраной, которое, очевидно, приводит к дезинтеграции последней и «рассасыванию» цитоплазматического содержимого. Подтверждению этому служит обнаруженный клеточный каркас с характерными разрывами, через которые могла произойти «утечка» цитоплазматического материала. При детальном исследовании установлено, что фрагментация клеточной стенки бактерий может происходить, во-первых, на участке перегородки, растущей в направлении к центру, и, во-вторых, сразу в нескольких местах. Соответственно можно предположить два возможных механизма действия тритона Х-100 на поверхность клеток пропионовокислых бактерий. В первом случае чувствительным к детергенту оказывается участок клеточной стенки, где обычно локализуются специфические ферменты, которые вследствие первоначальных изменений в структуре клеточной стенки, вызванных ПАВ, могут каким-то образом активироваться и способствовать ее дезинтеграции. Подобное явление наблюдалось при изучении влияния цетилтриметиламмонийбромида на клеточную стенку стафилококков. Во втором случае подходящей мишенью для тритона Х-100 мог служить белок неизвестной природы, встречающийся в клеточных стенках пропионовокислых бактерий. Учитывая тот факт, что некоторые белки в клеточных стенках грамположительных бактерий занимают отдельные участки, такой механизм кажется вполне приемлемым /8/.

В результате проведенных электронно-микроскопических исследований установлено, что взаимодействие ПАВ с поверхностью грамположительной бактериальной клетки можно разделить на несколько этапов.

1. Адсорбция ПАВ, по-видимому, первоначально происходит на участках, где его сродство с амфифильным фрагментом клеточной стенки является наибольшим. Затем следует взаимодействие молекул (или мицелл) ПАВ с белками, образующими поры, (поринами), что приводит к существенным структурным изменениям в порах бактериальной стенки. В результате нарушается ее проницаемость, а вследствие этого – сокращается цитоплазма.

2. Солюбилизирующая способность ПАВ в дальнейшем проявляется в виде частичной дезинтеграции клеточной стенки, позволяющей молекулам детергента проникать глубже в клетку и непосредственно контактировать с цитоплазматической мембраной. Обнаружены различия в дезинтегрирующем действии тритона Х-100 на делящиеся и покоящиеся клетки. В первом случае дезинтеграция клеточной стенки всегда происходит на участке перегородки, растущей к центру клетки, причем процесс активируется в результате перестроек в клеточной стенке, наступающих после действия ПАВ. Во втором случае клеточная стенка фрагментируется по участкам, которые, вероятно, содержат белковые компоненты.

3. На заключительной стадии действия ПАВ наблюдается «утечка» цитоплазматического содержимого из оставшегося клеточного каркаса, что позволяет предположить наличие в клеточных экстрактах соединений, синтезируемых данными микроорганизмами /9/.

Удалось также выяснить, что процесс взаимодействия ПАВ с поверхностью бактерий затрагивает такие важные моменты структурно-функционального единства живой клетки, как проницаемость, взаимосвязь амфифильных компонентов в поверхностных слоях и мембранах, а также целостность третичной и вторичной структур белков /10/.

Методом сканирующей электронной микроскопии установлена картина дезинтегрирующего действия 1%-го додецилсульфата натрия (ДСН) на клетки пропионовокислых бактерий. Это ПАВ в течение 1 ч инкубации с бактериальными клетками приводит их к лизису и фрагментации клеточных стенок с образованием высокомолекулярных агломератов.

Чрезвычайно разнообразны данные /4/, касающиеся воздействия ПАВ на клеточные стенки бактерий и полученные на основании биохимических экспериментов без помощи электронной микроскопии. Установлено, что механизм действия ПАВ на изолированные клеточные стенки различных грамотрицательных бактерий заключается во взамиодействии детергента с липидами, липопротеинами и липополисахаридными фрагментами клеточных стенок, а не в действии на разрыв дисульфидных (-S-S-) связей, как полагалось ранее.

При обработке клеток E.coli лизоцимом и версеном в течение 30–45 с в ледяной бане они становятся чувствительными к литическому действию неионогенного детергента бридж-58. Степень лизиса зависит от концентрации детергента. Эффективность действия этого НПАВ в тысячу раз меньше, чем ДСН и ДОХ. Разрушение клеток под воздействием ПАВ зависит от концентрации ионов магния в среде, ионной силы и времени лизиса. В присутствии Mg2+, концентрация которого составляет 70 мМ, из клеток выходят только низкомолекулярные РНК и растворимые белки, а при концентрации 40 мМ 70 S субъединицы и рибосомные фрагменты выделяются вместе с растворимым материалом. При более низких концентрациях Mg2+ в экстракционном растворе обнаруживаются полирибосомы, а при падении ее ниже 5 мМ из клеток выходит ДНК. Предполагаемый механизм действия НПАВ на клеточные стенки и мембраны можно представить следующим образом. Поверхность клетки является своеобразным молекулярныи ситом с порами, размер которых зависит от концентрации Mg2+ и ионной силы окружающей среды. Можно также предположить, что местом действия НПАВ является слой клеточных стенок бактерий /11/.

В условиях, при которых ДСН и тритон Х-100 полностью, а бридж-58 частично растворяют клеточную стенку E.coli, лаурилсаркозилат вызывает избирательную диссоциацию цитоплазматической мембраны (ЦПМ). Наличие ионов магния при обработке клеточных стенок препятствует растворению цитоплазматической фракции лаурилсаркозилатом. Тритон Х-100 в этих условиях растворял только ЦПМ и не действовал на наружную мембрану.

Изучено влияние солей KCl, NaCl, NH4Cl, (NH4)2SO4 на антимикробную активность неионных ПАВ, в частности по отношению к стафилококкам. Механизм действия одновалентных катионов в это случае связан с воздействием ПАВ на клеточную стенку способностью конкурировать с антимикробными агентами. Установлено, что мутант стафилококков, дефектный по липолисахаридам, имеет повышенную чувствительность к дезоксихолату и таким КПАВ, как гексадецилпиридинхлорид, бензаммонийхлорид. Присутствие большого количества липополисахаридов и белков с фосфолипидом на внешней мембране являются решающим фактором, который определяет устойчивость грамотрицательных микроорганизмов к детергентам. В отношении устойчивости к ПАВ бактерий-деструкторов, например псевдомонад к ДСН, полагают, что большая устойчивость штамма-деструктора по сравению с мутантным штаммом (не способным разрушать ДСН) обусловлена не столько наличием специфических ферментов, разрушающих ПАВ, сколько особенностями биохимического состава клеточной стенки /5/.

Ряд авторов /12/ отмечают также, что «молодые» бактериальные клетки, выращенные на полноценной питательной среде, Устойчивее к действию ДСН, чем клетки более поздней фазы роста. Существенное значение также заряд клеточной поверхности. При щелочном значении рН на поверхности клетки уменьшается число положительно заряженных групп, в соответствии с этим снижается и количество сорбированного на поверхности ПАВ за счет электростатического притяжения гидрофильной части молекулы ДСН, несущей отрицательный заряд. Вследствие этого количество ПАВ на поверхности обусловлено теми гидрофобными участками, с которыми взаимодействует алкильная часть молекулы ДСН. Таким образом, ПАВ способны взаимодействовать с различными компонентами клеточных стенок бактерий, включая муреиновый слой, белки, липиды, липопротеины, липолисахариды. Проникновение ПАВ внутрь клеток, если оно затруднено пространственными или электростатическими факторами, может происходить и через поры. Существенную роль в устойчивости микроорганизмов к действию детергентов играет «электростатическое экранирование», обусловленное наличием заряженных функциональных групп на поверхности их клеток, а также присутствием ионов металлов в среде /5/.

Рассмотрим общую характеристику мембран. На электронных микрофотографиях ультратонких срезов клеток бактериальная клеточная мембрана выглядит как двойная линия шириной около 8 нм. Она состоит из двух слоев фосфолипидов, в которые включены мембранные белки. Самой перспективной и наиболее убедительно трактующей современные экспериментальные данные считается метаморфно-жидкостно-мозаичная модель структуры мембраны. С ее помощью объясняется и присутствие в мембранах белков двух типов: периферических и интегральных. Первые переходят в надосадочную жидкость при отмывании мембран буферными растворами с различными значениями рН или ионной силы. Вторые – внутренние белки, сохраняющие связь с мембранами после проведения перечисленных операций и освобождающиеся только после разрушения фосфолипидного бислоя. Следует отметить, что обычно интегральные белки имеют амфифильную природу и способны к самоагрегации в водных растворах. Большая часть мембранных белков бактерий является белками-переносчиками и ферментами, ответственными за биосинтез макромолекул. В настоящее время известно около 20 различных белков бактериальных внешних мембран, некоторые из них синтезируются в больших количествах. ПАВ является уникальным инструментом для для извлечения белков из бактериальных мембран /12/.

Принципиальное сходство в действии НПАВ и АПАВ свидетельствует о том, что главным агентом фрагментациимембраны являются не заряженные гидрофильные группы детергента, а гидрофобная часть молекулы. Отсюда следует, что мицелла, соприкоснувшись с поверхностью мембраны, вероятно, изменяет свою конфигурацию, обнажая гидрофобные группы. В такой форме ПАВ взаимодействует с мембраной, главным образом за счет неполярной гидрофобной части молекул, что, по-видимому, сопровождается солюбилизацией ПАВ в гидрофобных участках мембраны. При этом последняя дробится на более или менее крупные липопротеидные фрагменты, солюбилизированные благодаря присутствию в них ПАВ /13/.

Связывание детергента с мембраной зависит от числа связывающих мест и от степени их сродства к молекулам детергента. Число мест связывания при высоком уровне сродства невелико, что, в свою очередь, слабо влияет на конформацию мембранных белков. С увеличением концентрации детергента постепенно начинают насыщать места связывания с высоким сродством к детергенту. Этим объясняется «мягкое» воздействие НПАВ на мембраны, так как значения их концентрации мицеллообразования (ККМ) ниже, чем в случае АПАВ. При изучении последовательности действий КПАВ на цитоплазматические мембраны стрептококков установлено, что в первую очередь изменяется проницаемость мембран. Этим обусловлено нарушение тех функций мембран, которые зависят от их нативной проницаемости – транспорта веществ и преобразования энергии. Действие более высоких концентраций КПАВ сопровождается солюбилизацией белковых и липидных компонентов мембран, изменением вторичной структуры белков и инактивацией их ферментных систем. Нарушение проницаемости мембран стрептококков под влиянием катионных детергентов определяется действием этих соединений на липидные компоненты мембран, что приводит к изменению структурной организации их гидрофобной области /14/.

Установлено, что КПАВ действуют на фосфолипидные компоненты мембран протопластов у стрептококков, лизис которых является результатом вторичных осмотических явлений. АПАВ, наоборот, воздействует на белковые компоненты мембран. В результате ингибирования лизиса протопластов после предварительной обработки последних ионами уранила подтверждена важная роль фосфатных групп в механизме действия ПАВ на мембрану. Предполагается, что АПАВ и КПАВ действуют на различные участки мембраны или на один и тот же участок, но различными путями. В ряду алкилсульфатов натрия ДСН обладает наибольшей литической активностью по отношению к ЦПМ протопластов дрожжей. Ряд специалистов полагают, что сорбция ионов ПАВ происходит главным образом на мембранных компонентах липидной природы, а взаимодействие с участием белковых компонентов мембраны /15/.

Советский ученый В.А. Тукмачев предложил модель действия ПАВ на мембраны, согласно которой иго ион (или молекула) сорбируется на мембране, внедряясь в нее своей липофильной частью, и действует на мембранное окружение по принципу клина. При сорбции на мембране определенного количества ионов (или молекул) ПАВ прочность мембраны резко падает, в результате чего она разрушается. Взаимодействие гидрофильных групп с мембранным окружением в этой модели не учитывается. Предполагается, что в литическом процессе это взаимодействие играет второстепенную роль. Е. Фриз (Швеция) предложил следующий механизм взаимодействия ПАВ и мембраны /8/.

1. Связывание детергента без интеграции. При низких концентрациях молекулы ПАВ связываются с мембраной, вероятно, в результате вторжения во внешний слой липидного бислоя.

2. Лизис. Как только концентрация свободного мономера ПАВ достигает определенного уровня, присутствующие молекулы ПАВ дестабилизируют мембрану.

3. Диссоциация мембраны в раствор. При высокой концентрации раствора вся мембрана оказывается окруженной молекулами ПАВ, и дальнейшее их добавление приводит к смене фаз: мембраны перестраиваются в смешанные мицеллы, содержащие детергент-липидные или детергент-белковые комплексы.

4. Освобождение белков от липидов. С увеличением концентрации добавляемого ПАВ количество липидов уменьшается до тех пор, пока все белки не освободятся от них. Экспериментальное подтверждение выдвинутой гипотезы в отношении механизма действия ПАВ было получено при изучении влияния дезоксихолата натрия (ДОХ) на вирус леса Семлики. Так, при концентрации ПАВ 1,5 мМ наблюдалось разрушение вируса и одновременное высвобождение липидов и белков; при 2 мМ ДОХ все мембранные белки освобождались от липидов и образовывали комплексы больших размеров. Увеличение содержания детергента до 5 мМ приводило к возрастанию размеров безлипидных белковых комплексов. Аналогичные результаты получены при действии на этот объект тритона Х-100 и ДСН; различными были лишь концентрации ПАВ, приводившие к одинаковому эффекту.

Причины, по которым до сих пор нет общепринятой схемы механизма действия ПАВ, известны – это отсутствие точных данных о строении и составе бактериальных мембран, а также помехи, которые возникают в результате влияния химических реагентов, присутствующих в среде выращивания. Однако в настоящее время на основе достаточно обширной научной информации можно предположить следующую модель действия ПАВ на мембраны микроорганизмов. Сначала происходит адсорбция молекул ПАВ на поверхности мембраны, изменяя ее проницаемость с последующим нарушением целого ряды функций. Затем при достижении ККМ начинается солюбилизация одного из амфифильных компонентов мембраны белка или липида в зависимости от их локализации и типа детергента. В результате солюбилизации нарушается структурная организация гидрофобных областей мембраны, ответственных за ее целостность. В свою очередь, нарушения такого рода приводят к дезинтеграции мембраны, распаду ее на фрагменты и образованию смешанных мицелл, состоящих из молекул ПАВ и мембранных амфифилов /14/.

В связи с тем, что исследование лизиса мембран под действием ПАВ является одним из активно развивающихся подходов в изучении ее структурной организации, можно ожидать новых, более точных и информативных моделей взаимодействия детергентов с биомембранами.

Другим не менее важным аспектом действия ПАВ на микроорганизмы является их влияние на процессы обмена веществ. За нарушением целостности клеточных структур в результате взаимодействия с детергентами должны последовать изменения на таких ключевых участках микробного обмена веществ, как транспорт и биосинтез молекул, реакция окислительного фосфолирования, фотосинтез /16/.

При изучении влияния твинов на изменение активности накопления α-кетоглутаровой кислоты бактериями псевдомонадами установлено, что твины 60 и 80 заметно увеличивают накопление α-кетоглутарата. Показано, что твин 80 при 0,6%-й концентрации совместно с добавками изолейцина, метионина, серина, лизина, инозита, аспарата усиливает биосинтез витамина В12 и не влияет на биогенез пропионовой кислоты при выращивании пропионовокислых бактерий на основной питательной среде, содержащей молочную сыворотку. При добавлении в питательную среду плесневелого гриба аспергилла твинов 40, 60 и 80 биомасса последнего увеличивалась в 2,5 раза, что сопровождалось накоплением алкалоидов. Максимальное (100%-ое) увеличение накопления алкалоидов наблюдалась при добавлении твина 80 0,5 – ой концентрации. В присутствии этого детергента скорость поглощения питательных веществ из среды возрастала на 27–50%. Полагают, что твин 80 непосредственно не участвует в биосинтезе алкалоидов, а действует как ПАВ, облегчает транспорт питательных веществ в клетку. Скорость образования фумаровой кислоты и ее выход в культуре гриба ризопус в присутствии твина 60 увеличивается на 43%, а при твине 40 и 60 – на 18%. При смеси двух видов твина эффект зависит от количественного состояния индивидуальных твинов /17/.

Обработка изолированных гетероцист цианобактерий катионным детергентом цетилметиламмонийбромидом повышает их проницаемость для внеклеточных нуклеотидов. Эффектом другого рода, вызванным влиянием детергентов, является изменение скорости потребления кислорода различными микроорганизмами. После обработки клеток сальмонелл лаурилсульфатом натрия значительно понижается дегидрогеназная активность клеток, гликолиз, а также потребление кислорода. Культивирование обработанных детергентом бактерий на среде в присутствии 10% глицерина приводит к восстановлению активности этих процессов. Однако выращивание энтеробактерий, устойчивых к детергентам, на среде с глюкозой и аспарагином в присутствии ДСН (10%) приводит к дополнительным энергозатратам, в результате чего урожай клеток снижается на 20%, а утилизация глюкозы и поглощение кислорода ускоряются соответственно на 30–35 и 60–75% по сравнению с выращиванием на среде без ДСН /18/.

Снижение урожая клеток на 20% происходит также при варьировании соотношения количества источников углерода и азота, при замене глюкозы другими сахарами. Полученные результаты свидетельствуют о дополнительном расходе энергии на осуществление активного транспорта соединений вследствие снижения величины мембранного потенциала в присутствии ДСН. При добавлении к суспензии голодающих клеток вибрионов твина 80 наблюдается уменьшение объема клеток, усиление потребления кислорода и возрастание теплоотдачи. Предполагают, что ПАВ влияют на способность этих бактерий использовать связанные с поверхностью питательные вещества.

В работах Р.В. Кучера с сотрудниками показано, что ПАВ комплексно влияют на процесс микробиологического окисления н-алканов, что приводит к улучшению проницаемости клеточных мембран, увеличению активности дегидрогеназ и концентрации растворимого кислорода у дрожжей, а также к солюбилизации углеводородов. ПАВ положительно воздействую на изменение растворимости гексадекана в присутствии дрожжей. Солюбилизация углеводородов является начальной стадией процесса их микробиологического окисления /19/.

При изучении взаимозависимых связей между концентрацией растворенного кислорода, удельной скоростью роста и дегидрогеназной активностью в присутствии ПАВ установлено, что детергенты при ферментации не включаются в ферментную систему, а улучшают проницаемость клеточных мембран, увеличивают аэрацию культуральной жидкости и спосбствуют транспорту кислорода и субстрата к клеткам растущей культуры. Биологическое действие ПАВ на ферментативные процессы и взаимосвязь параметров ростамикроорганизмов объясняются, по-видимому, физико-химическими причинами, связанными с образованием мицелл в культуральной жидкости /20/.

Биоэнергетические процессы в микробных клетках также оказываются затронутыми при внесении детергентов в окружающую среду. В результате исследований влияния тритона Х-100 и дезоксихолата натрия на основную дыхательную цепь и цианидрезистентный путь переноса электролитов в митохондриях установлено, что в малых концентрациях тритон Х-100 ингибирует перенос электрона в электронно-транспортных цепях хлоропластов, митохондрий и бактерий. Предполагают, что механизм его действия при низких концентрациях заключается в модификации структуры некоторых участков мембраны. Кроме того, тритон Х-100, перераспределяясь между водной и гидрофобной фазами, вызывает такие структурные перестройки в липидах, которые приводят к отрыву от мембран довольно крупных фрагментов, содержащих окислительно-восстановительные фрагменты. Это и обуславливает ингибирование переноса электронов в дыхательные цепи. Полученные данные свидетельствуют также о неоднородности распределения ферментов цепи переноса электронов по мембране и существования фонда специфических белков, не связанных с остальными компонентами цепи. Интересно отметить, что при использовании целых клеток микрококков эндогенное дыхание в них под действием тритона Х-100 падало не полностью. Это означает, по-видимому, что клеточная стенка препятствует распаду цитоплазматической мембраны на отдельные мембранные пузырьки, как это, вероятно, происходит в протопластах. Доступность внутренней поверхности цитоплазматической мембраны при действии даже значительных концентраций детергента все равно лимитируется какими-то пространственными ограничениями.

Таким образом, ПАВ выступают в качестве своеобразных регуляторов микробного обмена веществ и могут оказывать влияние на рост и развитие некоторых микроорганизмов, включая дрожжи, растущие на отходах нефтепроизводства, а также пропионовокислых бактерий – синтетиков витамина В12. Эти особенности ПАВ требуют дальнейшего изучения, что позволит в будущем использовать их в биотехнологических производствах.

ПАВ способны вызывать дезинтеграцию клеточных структур микроорганизмов и активно влиять на реакцию обмена веществ. Это свойство детергентов широко используется для лизиса микроорганизмов и имеет большое практическое значение, особенно при патогенных формах. При исследовании влияния длины углеводородной цепи ПАВ неароматических четвертичных аммониевых солей и неионных оксидов аминов на их ККМ и антимикробную активность установлено, что с ростом этой длины минимальная ингибирующая концентрация увеличивается, а значение ККМ уменьшается. Так, наибольшей антимикробной активностью обладают ПАВ при ККМ ниже 100 мгк/мл /19/.

В результате изучения генетики гибели и ультраструктуры грамположительных и грамотрицательных бактерий после воздействия алкилдиметиламмонияхлорида установлено, что низкие концентрации (0,0001%-е) оказывают выраженный бактерицидный эффект, который выше по отношению к грамположительным бактериям. Определяющим в механизме действия КПАВ является нарушение целостности цитоплазматической мембраны. В цитоплазме погибших бактерий выявлены мембранные структуры различной конфигурации и локализации, не связанные с делением клетки и явяляющиеся, по-видимому, результатом самосборки распавшихся под воздействием детергента липидных компонентов мембран. Выращиванию культуры на среде с диталаном приводит к нарушению процесса спорообразования. Показано, что клетки, находящиеся в состоянии покоя, проявляют большую устойчивость к высоким дозам детергента. Противомикробная активность КПАВ может увеличиваться при включении в их молекулы остатков пропионовой и уксусной кислот /9/.

Установлено /4/, что анионные и неионные детергенты, содержание которых не превышает 0,001–0,4%, не влияют на рост дрожжей. Однако при больших концентрациях эти ПАВ оказывают заметное фунгицидное и фунгистатическое действие. Различное влияние оказывают ПАВ при их совместном использовании с антибиотиками и другими лекарственными препаратами. Так, наблюдался эффект усиления действия тетрациклинов в отношении устойчивости грамотрицательных микроорганизмов с помощью катамина АБ, что объясняется повышенным накоплением антибиотика клетками при обработке их ПАВ. В то же время установлено, что снижение в присутствии НПАВ антибактериальной активности поливинилпироллидониода, бензолкониумхлорида и гексахлорфенола в отношении стафилококков и псевдомонад. ПАВ нашли применение и в некоторых вирусологических исследованиях. При изучении влияния различных концентраций щелочного раствора твина 20 (0,2%-го) на физические и биологические свойства вируса Сендай установлена потеря гемолитической активности и заметное уменьшение его инфекционности. В зависимости от концентрации детергента фрагментаы оболочки вируса различались чувствительностью к эритроцитам, биологической актиновностью и физическими свойствами. НПАВ оказались активными также по отношению к вирусу герпеса. Несомненно, что быстрейшее выяснение механизма действия ПАВ позволит с большим успехом применять детергенты как антимикробные средства /21/.

При изучении чувствительности микроорганизмов ПАВ установлена следующая особенность: если питательную среду, содержащую 0,05% додецилбензолсульфоната (сульфонола), подвергнуть кипячению, то в ней погибают все микроорганизмы. После посева в ней могут расти только грамотрицательные бактерии. Это свойство сульфонола использовано для стерилизации питательных сред, предназначенных для грамотрицательных микроорганизмов. Клетки бактерий, растущие при 0,05%-й концентрации детергента, а также более высокой, являлись грамотрицательными. Пороговой концентрацией в питательной среде, при которой могли расти грамположительные бактерии, была 0,008-я и более низкая. Деление бактерий по чувствительности к додецилбензолсульфонату может служить одним из признаков, на основании которых производится классификация микроорганизмов /22/.

**1.2 Щелочные протеиназы рода Bacillus**

Внеклеточные щелочные протеиназы выполняют ряд важных катаболических функций вне клетки. Наиболее очевидной функцией щелочных протеиназ является расщепление белков и других высокомолекулярных субстратов, содержащихся в питательной среде, и превращение их в форму, способную легко проникать внутрь микробной клетки. Щелочные протеиназы играют определенную роль в других жизненно важных процессах клетки. Предполагается, что сериновая протеиназа выполняет три внутриклеточные функции: 1) участвует в синтезе белковой оболочки, вероятно, снабжает аминокислотами, 2) играет роль мусорщика – убирает ненужные вещества клетки, 3) принимает участие в модификации ферментов, особенно РНК-полимеразы /23/.

В 1938 г. Кунитц впервые высказал предположение о существовании связи между процессом спорообразования и активностью щелочной протеиназы. Внеклеточные щелочные протеиназы бактериального происхождения, главным образом из Bacillus subtilis, изучены более детально. Это – ферменты широкой специфичности, гидролизуют до 80 связей в белках, с оптимумом рН в щелочной зоне. Впервые фермент был выделен, очищен и охарактеризован в лаборатории Карлсберга (Копенгаген). Фермент был назван субтилопептидазой А, алкалазой, субтилизином А, а затем за ним закрепилось название субтилизин Карлсберг. Позднее, в той же лаборатории из другого штамма Bac. subtilis был получен другой фермент. Этот фермент получил название субтилизина Novo. Несмотря на большое сходство с субтилизином Карлсберг, он все же не был идентичен ему, отличаясь некоторыми физико-химическими и энзиматическими свойствами. Одновременно с этими исследованиями в Японии была выделена протеиназа, продуцируемая культурой Bac.amyloliquefaciens. Она получила название BPN’. Таким образом, в настоящее время изучено три щелочные протеиназы типа субтилизина. Они имеют много общих свойств, но тем не менее субтилизин Карлсберг отличается от субтилизинов Novo и BPN’, являющихся идентичными. Молекулярный вес субтилизинов 27 000. При рН 5,0 и ниже фермент быстро и необратимо инактивируется. Оптимум рН действия для всех субтилизинов лежит в области рН 9–10. Ферменты проявляют широкую специфичность при гидролизе белков. Обладают эстеразной активностью /24/.

Несмотря на значительное сходство: 1) в ферментативном поведении, 2) гидролизе одних и тех же субстратов, 3) сходной реакции по отношению к одним и тем же ингибиторам, 4) близости происхождения, субтилизины отличаются между собой. Изоэлектрическая точка субтилизина Карлсберг лежит в зоне рН 9,4, субтилизина Novo и BPN’ – 7,8. Субтилизин состоит из одной пептидной цепи и 275 аминокислотных остатков. Субтилизины – одни из немногих белков, для которых определна трехмерная структура и построена модель молекулы.

По механизму действия и субстратной специфичности субтилизины близки к сериновым протеиназам животного происхождения – химотрипсину, трипсину, несмотря на отсутствие какого бы то ни было сходства в структуре между ними /25/.

Характер регуляции биосинтеза щелочных протеиназ изучен недостаточно. Щелочным протеиназам принадлежит ряд важных функций в процессах клеточной дифференцировки, в частности спорообразования. Известно, что щелочные протеиназы различных типов образуются в основном спорообразующими видами бактерий, причем образование фермента тесно связано с процессом спорообразования /26/.

Спорообразующие виды бактерий являются продуцентами многих биологически активных соединений. Образование ряда антибиотиков, ферментов и токсинов начинается после завершения активного роста продуцентов и совпадает с началом их споруляции. Поэтому выяснение связи процесса споруляции с образованием различных биологически активных соединений и изучение функций этих соединений представляет важность для разработки как общих принципов, так и частных методов селекции высокопродуктивных штаммов спорообразующих микроорганизмов. Следует отметить, что большинство продуцентов, характеризующихся сверхсинтезом фермента, в генетической плане практически не изучены /27/.

Исследования подобного рода представляют также определенный интерес и в связи с изучением механизма дифференцировки спор, поскольку ряд биологически активных соединений, накапливающихся при споруляции, по-видимому, участвует в регуляции различных этапов этого процесса.

**1.2.1 Генетика и физиология спорообразования различных видов рода Bacillus**

Жизненный цикл спорообразующих бактерий состоит из прорастания споры, вегетативной стадии, перехода к споруляции и завершается образованием зрелой споры. Причем изменения структуры клетки при переходе в споруляционное состояние осуществляются во времени и составляют несколько этапов.

На модели Bac. subtilus установлена последовательность из семи этапов споруляции /28/, характеризующихся определенными морфологическими изменениями. Выяснению последовательности этапов спорообразования во много способствовало также выделение мутантов, неспособных образовывать зрелые споры – «spo» – мутанты. В зависимости от нарушения определенного этапа спорообразования данные мутанты классифицируют как spo0, spoI, spoII и та далее.

Генетическое нарушение определенного этапа спорообразования характеризуется отсутствием ряда морфологических и биохимических функций, т.е. определенными фенотипическими последствиями. Например, характерной чертой spo0-мутантов, имеющих нарушение «0» стадии споруляции, является плейотропность, т.е. наряду с нарушением способности клеток спорулировать не осуществляется ряд биохимических событий, таких, как образование протеиназ, пептидных антибиотиков, сохраняется чувствительность к некоторым фагам и исчезает компетентность при трансформации.

Более детальный анализ показал, что как переход от вегетативной стадии роста к спорообразованию, так и переключение с одного этапа спорообразования на другой коррелирует с рядом биохимических изменений в клетке, в частности со снижением синтеза общей РНК, модификацией синтеза ДНК, а также с появлением определенных биологически активных соединений. Результаты генетических исследований различных классов мутантов показали, что процесс спорообразования определяется полигенной системой, локализующейся в различных районах хромосомы Bac. subtilus (более 100 генов). В настоящее время на хромосоме Bac. subtilus локализовано 28 оперонов, отвечающих за VII этапов процесса спорообразования /29/.

Считается, что регуляция спорообразования может осуществляться на нескольких уровнях: на уровне транскрипции, трансляции и посттрансляционной регуляции.

**Регуляция спорообразования на уровне транскрипции.** Результаты исследования перехода клеток Bac. Subtilus от вегетативной стадии к спорообразованию показали, что этот процесс во многом определяется изменением матричной активности РНК-полимеразы вегетативных клеток на раннем этапе споруляции. Показано, что во время вегетативного роста 85% иРНК транскрибируется с тяжелой нити ДНК и лишь 15% – с легкой нити. Популяция иРНК спорулирующих летокпредставлена иРНК, транскрибирующейся как с легкой, так и с тяжелой нити ДНК, причем с преимущественным синтезом иРНК на матрице легкой нити ДНК. На основании этих данных было сделано предположение, что споруляционные гены имеют специфичные промоторные участки на легкой нити ДНК /30/.

Показано, что бактериофаг β3 может инфицировать и реплицироваться в клетках Bac. subtilus, находящихся в логарифмической фазе роста, но не в спорулирующих клетках. В дальнейшем было обнаружено, что только РНК-полимеразы из клеток в логарифмической фазе обладает матричной специфичностью в отношении ДНКфага, тогда как РНК-полимераза спорулирующих клеток неспособна использовать ДНК данного фага как матрицу, но обладает повышенной активностью на синтетической матрице поли-dАТ. Вместе с тем подобного изменения матричной активности у мутантов с нарушенным спорообразованием в стационарной фазе роста не происходило. В связи с этим считают, что при переходе от вегетативного роста к спорообразованию происходит модификация специфичности РНК-полимеразы, следствием чего является прекращение считывания вегетативных членов и «включение» экспрессии споровых генов /31/.

Первоначально считали, что изменение специфичности РНК-полимеразы связано с модификацией β-субъединицы фермента, причем появление модифицированной субъединицы происходит за счет ее протеолитического расщепления щелочной протеиназы. Эти выводы были сделаны на основании того, что РНК-полимераза, выделенная из вегетативных и спорулирующих клеток, имела β-субъединицы с разным молекулярным весом. Таким образом, изменение матричной специфичности РНК-полимеразы не связано с модификацией минимального фермента, а, по мнению некоторых авторов, связано с утратой или инактивацией σ-фактора /32/.

Таким образом, природа изменений РНК-полимеразы при переходе от вегетативных клеток к споруляции и роль этих изменений в ее матричной активности для включения процесса спорообразования окончательно не установлены. Вместе с тем данное направление исследования во многом определит выяснение природы перехода клеток к споруляции.

**Регуляция спорообразования на уровне трансляции.** Известно, что процесс спорообразования начинает осуществляться в стационарной стадии развития Bacillius, на которой происходят многочисленные изменения в аппарате трансляции клетки. В связи с этим определение изменений в данном аппарате, которые связаны именно со споруляционным процессом, затруднено. Это объясняется следующими причинами. Для обнаружения изменений в аппарате трансляции необходимо выделение, изучение и сравнение внутриклеточных компонентов, участвующих в трансляции, из вегетативно растущих клеток, клеток в стационарной фазе и спор. Однако в связи с тем, что количество нуклеаз и протеинах к моменту начала процесса спорообразования значительно возрастает, компоненты трансляционного аппарата претерпевают неспецифические модификации в момент своего выделения /33/.

До настоящего времени окончательно не установлено существование стабильных иРНК, специфичных для спорообразования. Однако имеются данные, указывающие на наличие стабильных споруляционных иРНК. Добавление меченого актиномицина D к культуре Bac. subtilus через определенные промежутки времени от начала процесса спорообразования позволило обнаружить различные классы спороспецифичных иРНК /32/.

Результаты изучения ДНК-РНК-гибридизации также указали на существование стабильной фракции иРНК в прикрепленных к мембране полирибосомах спорулирующих клеток, обработанных актиномицином D. Рядом исследователей показано, что при переходе к споруляции рибосомы вегетативных клеток претерпевают изменения. В результате использования белок-синтезирующей системы in vitro обнаружено, что у Bac. subtilus рибосомы становятся неспособными транслировать вегетативные иРНК при переходе клеток к споруляции. Таким образом, на основании данных, указывающих на наличие стабильной фракции иРНК, изменений в структуре рибосом, конформационных изменений в клеточной мембране, можно предполагать возможность функциональных изменений механизма, который определяет специфичную для процесса спорообразования трансляцию /31/.

**Посттрансляционная регуляция спорообразования.** Регуляция спорообразования на посттрансляционном уровне в настоящее время изучена недостаточно, однако считается, что этот вид регуляции, связанный с модификацией белков клетки, является необходимым для завершения споруляционного процесса. Обнаружен специфичный состав белков для каждой стадии спорообразования. Считается, модификация РНК-полимеразы, субъединиц рибосом и мембранных компонентов клетки происходит в результате посттрансляционных изменений и связана с фосфорилированием, аденилированием уже существующих белков, а также с образованием пептидных антибиотиков /27/.

**Роль щелочной протеиназы в процессе спорообразования.** В процессе споруляции Bac. subtilus образуются тир протеолитических активных фермента: сериновая протеиназа (субтилизин), работающая при щелочных значениях рН, в связи с чем в литературе обычно приводится название щелочная протеиназа; металлсодержащая протеиназа (нейтральная), рН оптимум которой находится в нейтральной зоне рН, и эстераза – фермент, обладающий невысокой протеолитической активностью. Различные представители рода Bacillus обладают специфической способностью к образованию определенного типа внеклеточной протеиназы. Так, Bac. megaterium и Bac. cereus синтезируют только нейтральную протеиназу, в то время как Bac. licheniformis, Bac. natto и Bac. subtilis образуют как нейтральную, так и щелочную протеиназы. Следует отметить, что Bac. subtilis по способности образования протеиназы различного типа можно подразделить на четыре группы; к первой относятся штаммы, синтезирующие только щелочную протеиназу, вторая группа образует только нейтральную протеиназу, представители третьей группы выделяют в среду как щелочную, так и нейтральную протеиназы, щелочная протеиназа у представителей четвертой группы появляется в среде только после того, как исчезнет нейтральная протеиназа /34/.

Установлено, что нейтральная протеиназа не участвует в процессе спорообразования, тогда как щелочная протеиназа необходима для включения данного процесса. В частности, выделен температурочувствительный по щелочной протеиназе мутант Bac. subtilis ts5. В условиях инкубации при 470С, т.е. температуре, при которой проявляется дефект температурочувствительного субтилизина, мутант не спорулировал. Восстановление активности щелочной протеиназы при 300 сопровождалось споруляцией вегетативно растущих клеток. Момент нарушения процесса спорообразования у данного ts5 мутанта совпадает с 0 стадией споруляции /35/.

В то же время описана большая группа плейотропно негативных мутантов, которые имели блок на 0 стадии спорообразования и характеризовались отсутствием способности к образованию щелочной протеиназы. Таким образом, из представленных данных можно судить о наличии корреляции между образованием щелочной протеиназы и спорообразованием. В последующих работах для определения участия протеиназ в процессе споруляции использовали два подхода. Первый подход состоял в создании условий, при которых ингибируется спорообразование. Обнаружено, что клетки, голодающие по тимидину, не спорулируют и не образуют такие экзоферменты, как протеиназы, рибонуклеазы, щелочную фосфатазу, при это не затрагивается только образование α-амилазы. На основании этих данных авторы предложили, что указанные ферменты прямо или косвенно связаны со спорообразованием /36/.

Вторым подходом для определения участия именно щелочной протеиназы в споруляционном процессе послужило использование специфичного ингибитора щелочной протеиназы – фенилметилсульфонилфторида (PMSF). Добавляя ингибитор через различные промежутки времени от начала процесса образования спор, обнаружили, что в осуществлении данного процесса имеется чувствительный период, продолжающийся 2–3 часа. Добавление ингибитора в этот период приводит к нарушению спорообразования, при этом не образуется щелочная фосфатаза, рибонуклеаза и термоустойчивые споры. Уровень синтеза нейтральной протеиназы в отсутствие ингибитора постоянно возрастает к началу спорообразования, затем либо незначительно снижается, либо достигает плато. Добавление PMSF приводит к возрастанию уровня накопления нейтральной протеиназы, при этом спорообразование отсутствует. На основании этих данных авторы сделали вывод о том, что нейтральные протеиназы по мере своего накопления разрушаются щелочной протеиназой и не участвуют в спорообразовании /26/.

Подтверждением того, что нейтральная протеиназа не принимает участия в процессе споруляции, послужили нормально спорулирующие мутанты Bac. subtilis, не обоазующие металлсодержащей протеиназы. Мутанты же, дефектные по образованию щелочной протеиназы, как правило – аспорогенны. Добавление ингибитора щелочной протеиназы после чувствительного периода не нарушает ни образования щелочной фосфатазы, ни появления светопреломляющих спор. Следовательно, щелочная протеиназа необходима для осуществления первых этапов спорообразования, в частности 0–1. Несмотря на то, что фермент продолжает накапливаться в течение всего периода спорообразования, для дальнейшего развития споры, по мнению авторов, щелочная протеиназа не явялется необходимой /27/.

Вместе с тем в ряде работ была показана важная роль щелочной протеиназы в модификации ферментов на поздних этапах спорообразования. Например, показано, что протеиназа может превращать фермент вегетативных клеток фруктозо-6-фосфатальдолазу в белок, специфичны для зрелых спор Bac. subtilis. Не исключено также возможное участие щелочной протеиназы в прорастании спор, при этом предполагают, что щелочные протеиназы, гидролизуюя белковую оболочку спор, включают их прорастание.

Все приведенные выше работы касаются роли внеклеточной щелочной протеиназы в спорообразовании.

Вместе с тем установлено, что к моменту начала процесса спорообразования Bac. subtilis образуется также и внутриклеточная щелочная протеиназа, уровень активности которой составляет 10% от соответствующего уровня внеклеточного фермента. Другие виды Bacillus, например Bac.megaterium, синтезируют, в отличие от Bac. Subtilis, толькл внутриклеточную щелочную протеиназу. В некоторых химических свойствах двух протеиназ существуют различия. В частности, указывается на наличие различной потребности в кофакторах и субстратной специфичности. Было также обнаружено, что двум щелочным протеиназам свойственна различная электрофоретическая подвижность. Внутриклеточная протеиназа обладает более узкой специфичностью в отношении эфиров и абсолютной потребностью в кальции. До последнего времени неясным остается вопрос о роли внутриклеточной протеиназы в спорообразовании Bac. Subtilis, хотя и описаны мутанты, у которых наряду с отсутствием активности внутриклеточной протеиназы не осуществляется процесс споруляции /34/.

Таким образом, процесс спорообразования регулируется на различных уровнях и образующиеся на разных этапах дифференцировки спор биологически активные соединения, в частности представляющие практический интерес, могут участвовать в регуляции этого процесса. В связи с эти принципы регуляции спорообразования представляют интерес. Однако в настоящее время еще мало известно о характере регуляции процесса спорообразования и регуляции синтеза соединений, специфичных для споруляции.

**1.2.2 Получение щелочных протеиназ**

1) Ряд авторов под руководством А. Мудерризаде Bacillus sp. выделили алкалофильный штамм Bacillus sp. в летний период из почвы на территории Университета Дикла (Турция) и определили по Берги. Почвенный образей суспензировали в 20 мл дистиллированной воды, инкубировали при 800С 5 мин. Затем 1 мл ресуспензировали в 9 мл дистиллированной воды и по 0,1 мл вносили в питательный агар. Через 72 ч инкубации при 370С отдельные колонии высевали для определения активности щелочной протеазы.

Выделенные культуры выращивали на различных средах. Основная Среда имела следующий состав (г/л): соевая мука 10; крахмал 10; КН2РО4; глюкоза 20; Na2CO3 10; рН 11,5. Культивирование проводили в колбах на 250 мл со 100 мл среды на качалке при 370С 58 ч. После выращивания клетки отделяли центрифугированием, супернатант использовали для очистки фермента. Все этапы очистки проводились при 40С.

Очистка щелочной протеазы. К фильтрату культуральной жидкости, доведенному до рН 11,5, при перемешивании медленно добавляли сульфат аммония до 75% насыщения. Осадок отделяли центрифугированием, растворяли в 20 мл трис-HCl-буфера, рН 8,8, с 50 мМ NaCl и диализовали против 1 л того же буфера в течение ночи. Диализованный фермент наносили на колонку с ДЭАЭ-целлюлозой (3×20 см), предварительно уравновешенную 10 мМ натрий-фосфатным буфером, рН 7,6 содержащим 50 мМ NaCl. Активные фракции собирали, затем проводили диализ в 10 мМ фосфатном буфере в течение ночи, затем наносили на колонку с КМ-целлюлозой (2×15 см), предварительно уравновешенную тем же буфером. Элюция проводилась линейным градиентам NaCl (200 мл, 0–0,5 М) в том же буфере. Активные фракции объединяли для хранения /37/.

2) МотинаЛ.И., Нахапетян Л.А. /38/, также разработали способ получения щелочной протеиназы. Они получали ее культивированием штамма Вacillus subtilis 72 на жидкой питательной среде следующего состава, %: картофельный крахмал-4; кукурузная мука-1; технический казеин – 0,1; БВК – 0,1; кукурузный экстракт – 0,05; аммоний фосфорнокислый двузамещенный – 0,01; культивирование в лабораторных условиях проводится на круговой качалке, имеющей 240 об/мин, при 400С; начальном рН среды 6,8, в колбах емкостью 750 мл с отбойниками (40 мл питательной среды) в течение 46 ч. Протеолитическая активность составила 10 тыс. ед/мл.

Культуральную жидкость (20 мл), содержащую щелочную протеиназу, наносят на хроматографическую колонку (1,5×20 см), наполненную силохромом С-80, модифицированным триэтоксилилмасляной кислотой (n=2, R-H–; 0,42 мг\*экв/г сорбента-содержание карбоксильных групп), уравновешенную 0,005 М фосфатным буфером с рН 6,0. Колонку промывают тем же буфером, при этом выходит основная часть пигмента, клетки продуцента и некоторые сопутствующие белки. Колонку промывают до тех пор, пока поглощение элюата при 280 нм не достигнет фоновых значений (D280≤0,1). Затем проводят элюцию щелочной протеиназы 0,005 М фосфатным буфером с рН 7,8, содержащим 0,2 М NaCl. Выход фермента по активности составляет 92%. Удельная активность фермента в расчете на белок увеличивается 5,4 раза. Элюат концентрируют методом ультрафильтрации на мембране УАМ-150, затем высушивают лиофильно. Полученный препарат светло-серого цвета имеет активность 1000640 ед/г препарата, содержание белка 530 мг/л. Удельная активность 1888 ед/мг белка.

3) Следующий способ получения щелочной протеазы заключается в следующем. Культуральную жидкость получают выращиванием продуцента Вacillus subtilis 72 на питательной среде следующего состава, %: карфтофельный крахмал-8; кукурузная мука-3; технический казеин-1; БВК – 0,5; кукурузный экстракт – 1,0; аммоний фосфорнокислый двузамещенный – 0,05.

Культивирование проводится на качалке при 240 об/мин, при 400С, начальная рН среды 6,9, в колбах емкостью 750 мл в течение 47 ч. Культуральную жидкость (40 мл) с активностью 12 тыс. ед/мл наносят на хроматографическую колонку (2,5×35 см), заполненную силохромом С-80, модифицированным триэтоксисилилундекановой кислотой (n=9; R-H-), уравновешенной дистиллированной водой пока поглощение при 280 нм не достигнет фоновых значений. Затем проводят элюцию щелочной протеиназы 0,05М фосфатным буфером с рН 8,0, содержащем 0,2 М NaCl. Элюат концентрируют методом ультрафильтрации на мембране УАМ-150 и высушивают лиофильно. Получают препарат светло-серого цвета с протеолитической активностью 1056550 ед/г препарата, содержание белка 550 мг/л /39/.

**1.3 Микробные липазы**

В последние годы для получения различных ферментов находят широкое применение микроорганизмы, которые характеризуются ценнейшими свойствами, обеспечивающими им за короткий цикл развития на доступных питательных средах и в производственных условиях синтез ферментов, необходимых для народного хозяйства /40/.

При этом биосинтез многих гидролаз можно регулировать и осуществлять направленно путем подбора соответствующих условий культивирования, и прежде всего состава питательной среды. Более того, многие микробные ферменты образуются в ответ на действие индуктора, вносимого в питательную среду, причем активность индуцированного фермента в ответ на добавление специфического субстрата возрастает в процессе роста микроорганизма многократно, тогда как на среде без соответствующего индуктора фермент образуется в минимальных количествах /41/.

Особенность микроорганизмов заключается в том, что они способны синтезировать внеклеточные ферменты, активность которых во много раз превышает уровень активности внутриклеточных. Таким образом, при определенных условиях микробная клетка может осуществлять «сверхсинтез». 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 /42/.

**1.3.1 Субстратная специфичность микробных липаз**

Микробная липазы способны гидролизовать животные жиры, растительные масла, а также синтетические моно-, ди- и триглицериды. Синтетические триглицериды являются лучшими субстратами для многих микробных липаз. 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 гидролизитах 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 /44/.

**1.3.2 Выделение микробных липаз из микроорганизмов**

Известны микроорганизмы, продуцирующие липазы, оптимум действия которых находится в области высоких температур: 50–550С Pseudomonas fragi, 700С Pseudomonas mephitica. В связи с этим представляется актуальным поиск активных продуцентов липаз, специфичных к твердым жирам, содержащимся в промышленных отходов, а также продуцентов липаз с более высокими температурными оптимума действия. Такие исследования имеют большое значение в связи с экологическими проблемами, связанными с очисткой сточных вод в масло-жировой промышленности /45/.

Первоначально скрининг продуцентов липаз проведен качественным методом Эйкмана, при котором в стерильные чашки Петри разливают тонким слоем простерилизованный животный жир и после его застывания вводят агаризованную питательную среду. Культуры высевали на питательную среду для получения гигантских колоний. Чашки выдерживали в термостате при 28–300С для мезофильных и 38–400С для термофильных культур в течение 5–7 суток, учитывали и отбирали культуры, вокруг колоний которых образовывались непрозрачные зоны гидролиза жиров. Активными считали культуры, образующие зоны, превышающие диаметр колоний. Для количественного определения липазной активности грибы выращивали в глубинных условиях в колбах Эрленмейера объемом 250 мл с 50 мл питательной среды на круговой качалке (150 об/мин) в течение 3–4 суток при 36–400С. Посевным материалом для иннокуляции питательной среды служила суспензия спор гриба. Липазную активность определяли в фильтрате культуральной жидкости. За единицу липазной активности принимали такое количество фермента, которое освобождает 1 мкМ олеиновой кислоты из 40% эмульсии оливкового масла в 10% растворе поливинилового спирта за 1 ч в условиях опыта.

При глубинных условиях выращивания липазную активность культур выявляли на различных питательных средах (%):

1) видоизмененная среда Чапека:

а) KH2PO4 – 0,1; MgSO4\*7H20 – 0,05; FeSO4 \*7H20–0,01; CaCO3-0,3; хлопковое масло и пептон – по 0,1;

б) минеральный состав с добавлением хлопкового масла и кукурузного экстракта по 1,0;

2) среда из 7% экстракта солодовых ростков с добавлением (NH4)2SO4 – 0,3; CaCO3 – 0,1 и хлопкового масла – 1,0;

3) среда с гидролизатом БВК -1,0; (NH4)2SO4 – 0,3; CaCO3 и хлопковое масло – по 0,1; рН питательных сред – 6,5–7,0.

Внутриклеточную липазную активность определяли в гомогенате сырой биомассы. Для этого 0,5 г биомассы, тщательно отмытой дистиллированной воды, растирали в фарфоровой ступке с кварцевым песком, доводили объем до 50 мл дистиллированной воды и выдерживали 2 ч при комнатной температуре, затем отфильтровывали через бумажный фильтр и фильтрат использовали для анализа. Активность рассчитывали на 1 г абсолютно сухой биомассы /46/.

Другой способ биосинтеза липазы заключается в следующем. Сначала была получена культура дрожжей Candida paralipolytica 739. Работа началась с использования питательной среды следующего состава (%): (NH4)2SO4 – 0,3; MgSO4 – 0,07; NaCl – 0,05; Ca(NO3)2 – 0,04; KH2PO4 – 1,0; K2HPO4 – 0,1; глюкоза – 0,5; дрожжевой автолизат – 0,1 (по сухому веществу). В качестве посевного материала использовали 48-часовую культуру, выращенную на косом агаре. Для опытов культуру дрожжей выращивали при 300С в колбах емкостью 750 мл со 100 мл среды на качалке при 240–250 об/мин в течение 2-х суток. Липазную активность в культуральной жидкости определяли по количеству олеиновой кислоты, образовавшейся в результате действия фермента на оливковое масло. В международной практике эмульсию оливкового масла в поливиниловом спирте в качестве субстрата используют для определения липазной активности и, в частности, для экзолипазы дрожжевой культуры Candida paralipolytica /47/. В данном опыте реакционная смесь содержала 2,5 мл 40%-ной эмульсии оливкового масла в 2%-ном поливиниловом спирте, 2 мл 1/15 М фосфатного буфера с рН 8 и 0,5 мл ферментного раствора. Реакцию проводили при 370С в течение 1 ч и прерывали добавлением 15 мл этанола. Полученную смесь титровали 0,05 н. NaOH в присутствии индикатора тимолового синего. Контрольные образцы обрабатывали так же, но без предварительной инкубации и немедленно оттитровывали. Результаты титрования определяли по разности между контролем и опытом. За единицу активности принимали количество, способное высвобождаться 1 мк/моль олеиновой кислоты из 40%-ной эмульсии оливкового масла при рН 8,0 и температуре 370 в течение 1 ч /48/.

При биосинтезе ферментов микроорганизмами большое значение имеют условия развития культуры и в первую очередь состав питательной среды. В связи с этим представляло интерес изучить влияние солей среды не биосинтез липазы культурой Candida paralipolytica 739. Путем поочередного исключения солей установили, что все минеральные соли, входящие в состав питательной среды необходимы для биосинтеза фермента. Выявили, что на образование липазы положительно влияют соли аммония и мочевина, нитраты заметно снижают активность липазы. Также проверяли зависимость липазной активности в культуральной жидкости от возраста посевного материала. Полученные данные позволяют сделать следующие выводы:

1) при биосинтезе липазы дрожжами Candida paralipolytica 739 максимальная липолитическая активность достигается в средах при использовании в качестве источника углерода глюкозы; дисахариды мальтоза, сахароза и лактоза несколько снижают активность фермента, а уксусная кислота полностью прекращает его синтез;

2) в углеводной среде соли аммония имеют преимущество по сравнению с нитратами как источником азота;

3) при биосинтезе немаловажную роль играет возраст посевного материала, максимальные показатели соответствуют двухсуточной культуре /49/.

Для определения липолитической активности использовали метод, основанный на титрометрическом определении свободных жирных кислот, образовавшихся при гидролизе липидов. В качестве субстрата использовали оливковое масло, эмульгированное поливиниловым спиртом (степень полимеризации 1725, вязкость 30 сП). Эмульсию готовили следующим образом: к 100 мл оливкового масла добавляли 150 мл 2%-ного водного раствора поливинилового спирта и эмульгировали в течение 20 мин при комнатной температуре (рН 8). Эмульсия была стабильна 24 ч. Реакционная смесь содержала 5 мл субстрата, 4 мл 0,1 М фосфатного буфера (рН=7,8). Реакционную смесь выдерживали 10 мин при температуре 340, прибавляли 1 мл ферментного раствора. После 60-минутного инкубирования реакцию останавливали добавлением 20 мл этанола и ацетона (1:1). Образовавшуюся олеиновую кислоту оттитровывали 0,05 н. щелочью в присутствии тимолфталеина. За единицу липазной активности принимали такое количество фермента, которое отщепляет 1 мкмоль жирных кислот от эмульсии триолеата за 1 ч при 340.

Ферментативный препарат липазы получали по следующей схеме: 1) отделение биомассы от ферментативного раствора; 2) осаждение фермента органическим растворителями или высаливание; 3) освобождение фермента от солей и низкомолекулярных примесей с помощью хроматографии на колонке с сефадексом Г-25 или диализом; 4) лиофилизация или осаждение ацетоном.

Ферментативный раствор центрифугировали 20 мин при 4000 об/мин для отделения биомассы. Согласно литературным данным, для получения сухого, частично очищенного препарата используют фракционное осаждение органическими растворителями (изопропанолом, этанолом, ацетоном). Оптимальный вариант для получения липазного препарата из ферментативного раствора Candida paralipolytica 739 – высаливание фермента сульфатом аммония /50/.

Фермент из ферментативного раствора осаждали фракционированием сульфатом аммония в интервале насыщения 0,4–0,7. Фермента с самой высокой липолитической активностью осаждался при степени насыщения сульфатом аммония 0,5. При более высокой степени насыщения вместе с ферментом выпадал и белок, не обладающий липолитической активностью. Концентрированный раствор фермента освобождали от солей и низкомолекулярных примесей на колонке с сефадексом Г-25 и диализом (вода) в течение 24 ч. После диализа или гель-фильтрации раствор фермента лиофилизировали или осаждали ацетоном. Препарат хорошо выдерживал лиофилизацию и не терял активности при хранении в лиофилизированном состоянии при температуре 40С в течение 6 месяцев.

Таким образом, можно сделать вывод, что исследованный препарат в дальнейшем может быть использован для получения высокоочищенной и кристаллической липазы, а также в некоторых отраслях народного хозяйства.

**1.3.3 Применение микробных липаз**

Использование микробных липаз в первую очередь связано с потребностью масложировой промышленности. Они стали широко использоваться для модификации жиров и масел. Следует отметить, что безконтрольный липолиз может вызвать неприятный привкус, связанный с накоплением свободных жирных кислот, для удаления которых требуется дополнительное центрифугирование. С другой стороны, специфичный вкус сыра частично обусловлен присутствием короткоцепочечных жирных кислот, образующихся в результате частичного гидролиза молочного жира под действием липаз, продуцируемых микроорганизмами, и липаз, присутствующих в самом молоке. Пикантный и характерный вкус итальянских сыров обусловлен действием специально добавляемой в молоко липазы, специфичной к короткоцепочечным жирным кислотам. Липазы могут быть рекомендованы для модификации жиров, используемых в производстве хлебобулочных изделий. Использование модифицированных жиров улучшает вкус, цвет, мягкость и структуру хлеба. В кожевенной промышленности микробные липазы используются для обезжиривания кожи. Липазы микроорганизмов в комплексе с другими ферментами применяются для биологической очистки сточных вод /51/.

Существует еще ряд причин, которые делают изучение липаз интересным и перспективным. Прежде всего это касается их использования в медицине. Так, управление липолитической активностью, вероятно, будет играть важную роль в будущих методах лечения нарушений жирового обмена, и, следовательно, в контроле за сердечно-сосудистыми заболеваниями. Определение активности сывороточной липазы широко используется в клинике для диагностики некоторых заболеваний. Врожденная гиперлипемия может возникнуть из-за дефицита липопротеидлипазы, а нарушения процессов депонирования жиров связывают с холестерол-эстеразой и сфингомиелиназой. В еще большей мере обнадеживает и способствует появлению новых гипотез тот факт, что эфиры холестерина с жирными кислотами являются основными компонентами атеросклеротических бляшек и что миелинизация развивающегося мозга коррелирует с уменьшением содержания эфиров холестерина /52/.

В последнее время проводятся целенаправленные исследования по использованию микробных липаз в составе моющих средств, шампуней, кремов и профилактических зубных паст. Важность применения липаз в составе моющих средств определяется не только их высокой эффективностью, но и связана с охраной окружающей среды. Известно, что фосфаты, используемые в качестве синтетических моющих средств, приводят к загрязенению сточных вод. Другим немаловажным фактором является то, что использование ферментов в составе синтетических моющих средств позволяет проводить стирку при более низких температурах, следовательно, приводит к экономии энергозатрат /40/.

За рубежом липазу используют для придания приятного запаха молочным продуктам. Для создания букета запаха в молочных продуктах используют липазы, специфичные к короткоцепочечным жирным кислотам. Для этих целей давно используют ферменты из поджелудочной железы различных животных. Широкое применение липаз в различных областях привело к увеличению числа компаний, производящих микробные липазы /41/.

Таким образом, спектр применения микробных липаз достаточно широк. Эффективность использования их зависит отряда факторов, прежде всего от специфичности липаз и условий проведения конкретного биотехнологического процесса.

Таким образом, на основании литературного обзора можно сделать вывод, что представители рода Pseudomonas широко распространены в природе. Они могут развиваться в самых различных условиях в природе, используя самые разные соединения углерода и азота в энергетическом и конструктивном обмене. Псевдомонады способны расщеплять СПАВ. ПАВ способны взаимодействовать с различными компонентами клеточных стенок бактерий, включая муреиновый слой, белки, липиды, липопротеины, липополисахариды.

Внеклеточные щелочные протеиназы выполняют ряд важных катаболических функций вне клетки. Наиболее очевидной функцией щелочных протеиназ является расщепление белков и других высокомолекулярных субстратов, содержащихся в питательной среде, и превращение их в форму, способную легко проникать внутрь микробной клетки. Наиболее активными культурами в отношении образования щелочных протеиназ являются различные виды из рода Bacillus, главным образом Bac. Subtilis.

Микроорганизмы обладают особенностью, которая заключается в том, что они способны синтезировать внеклеточные ферменты. Одним из промышленно важных ферментов, продуцируемых микроорганизммами, являются липазы. Изучение микробных липаз представляет большой теоретический и практический интерес, так как они могут использоваться в различных отраслях промышленности (масло-жировой, кондитерской, кожевенно-меховой, в медицине и др.)

**2. Объекты и методы исследования**

Целью данной работы являлось выделение, изучение свойств концентрированного ферментного препарата и его применение в процессе обезжиривания меховой овчины.

**2.1 Объекты исследования**

ПРЕВОЦЕЛЛ W-OF-7 представляет собой продукт оксиэтилирования технических жирных спиртов. По внешнему виду Превоцелл воскообразная масса белого цвета, растворяется при температуре 40–450С, устойчив в жесткой воде, а также в кислых и щелочных растворах. Обладает хорошей смачивающей способностью.

WETTER HAC – 100% активный, неионогенный смачивающий и отмачивающий агент, усиленный специальными бактерицидами и фунгицидами. На вид светло-янтарная, немного вязкая жидкость, растворимость неограниченная, рН – (вода) 6,8–7,2 (1% раствор). Применяется в отмоке вместе с обычным количеством соли, концентрация 1 г/л. Преимущества: предохраняет шерсть от вытекания и кожу от повреждения различными бактериями; обладает прекрасными моющими качествами, облегчая вымещение избыточных природных жиров, засохшей крови и чужеродных материалов как с волоса, так и с кожевой ткани.

DE-SOL-A – низкорастворимое моющее средство, на вид представляет собой белую пасту с рН 8–8,5 (1% раствор), растворимость – 10% дисперсионна. Применяется для мойки и обезжиривания меховой и шубной овчины (1,5 г/л DE-SOL-A, 1 г/л кальцинированной соды). Преимущества: гарантирует для шкурки: менее 1% жира в волосе и минимум натуральных жиров в кожевой ткани; позволяет чистое мездрение и более равномерное поглощение в пикеле и дублении; снижает возможность сваливания меха; выпускает шкурки белее, чище и оставляет волос рассыпчатым и открытым; улучшает равномерность окраски меха и кожи, вымещая из кожевой ткани натуральные жиры перед пикелем; стабилен в широком диапазоне рН, а также эффективен перед крашением для выравнивания цвета.

ГАММА представляет собой смесь высококачественных анионных, неионогенных ПАВ, полезных добавок. Препарат обладает высокой обезжиривающей способностью по отношению к натуральным жирам. Рекомендуется для обезжиривания кож КРС. Эффективен в жесткой воде, а также в присутствии электролитов и дубителей. Легко растворим в воде, в том числе и жесткой.

АГАР-АГАР представляет собой порошок белого цвета без постороннего запаха, вкуса. Наличие плесени и видимых посторонних включений не допускается. Физические и химические показатели должны соответствовать требованиям, указанным в табл 1.

Таблица 1. Физические и химические показатели агар-агара

|  |  |
| --- | --- |
| Наименование показателей | Норма |
| 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%, 0С, не ниже | 80 |
| Массовая доля влаги, %, не более | 18 |
| Массовая доля золы (в пересчете на сухое вещество), %, не более | 4,5 |
| Массовая доля общего азота (в пересчете на сухое вещество), %, не более | 0,2 |
| Наличие йода и тяжелых металлов | Не допускается |

**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 приготавливают следующим образом: 15 г. сухого бульона растворяли в 1 дм3 дистиллированной воды и кипятили 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

К 1 дм3 дистиллированной воды для удовлетворения потребности микроорганизмов в макро- и микроэлементах, без которых клетка расти не может, в синтетическую среду вводили соли следующего состава (г/дм3): NaH2PO4-1,0; NH4NO3-1,0; KCl – 0,5; MgCl2-0,1. В качестве источника углерода в конструктивном и энергетическом обмене использовали шерстный жир в количестве 1 г/дм3. Также добавляли СПАВ – 1 г/дм3 и агар-агар в количестве 2–2,5% от объема жидкой среды и автоклавировали.

**2.2.2 Выделение чистой культуры**

**Приготовление разведений.** Разведения делают в стерильной водопроводной воде. Готовят определенный объем этого раствора и стерилизуют при 1 атм в автоклаве. 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 мл полученного разведения и переносят его во 2-ую 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.

**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 мл) 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 материал не 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.

**2.2.3 Методика изучения культуральных свойств**

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

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.

Из колоний готовят мазки, затем окрашивают по Граму и Трухильо. Техника окраски по Граму заключается в следующем:

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

2) мазки окрашивают в течение 1 мин генцианвиолетом;

3) препарат промывают в слабой струе водопроводной воды в течение 2 сек.;

4) окрашивают препарат раствором Люголя в течение 1 мин.;

5) промывают препарат слабой струей водопроводной воды;

6) погружают препарат на 30 сек в 96%-ный спирт, взбалтывая последний, после чего препарат подсушивают промокательной бумагой;

7) окрашивают мазки раствором фуксина Пфейфера в течение 30 сек.;

8) 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:

1) мазок зафиксировать жаром;

2) нанести водный раствор малахитовой зелени (2%) и в течение 3 мин подогреть на спиртовке до отхождения влаги;

3) промыть водой;

4) опустить на 1 мин в 0,25%-ный водный раствор основного фуксина;

5) промыть водой;

6) высушить фильтровальной бумагой и микроскопировать.

Окраска жгутиков по Леффлеру

Окраска жгутков заключается в следующем:

Суспензию петлей наносят на чистое обезжиренное предметно стекло, наклоняют ее под углом 450 и высушивают на воздухе. Высушенный мазок заливают на 15–20 мин протравой Леффлера. Необходимо следить, чтобы протрава не подсыхала. За это время благодаря оседанию протравы на поверхности жгутиков они становятся видимыми в светопольный микроскоп.

Препарат промывают дистиллированной водой и окрашивают карболовым фуксином Циля в течение 3 мин. Краску смывают, препарат высушивают и микроскопируют. Клетки и жгутики окрашены в красный цвет.

**2.2.4 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.

**2.2.5 Протеолитические свойства микробов**

Протеолитические свойства проявляются выделением во внешнюю среду протеолитических ферментов, которые расщепляют белки до промежуточных продуктов (пептоны, полипептиды, аминокислоты) или до продуктов конечного распада (индол, сероводород, аммиак и др.)

Для выявления протеолитических ферментов исследуемую культуру засевают в питательную среду, содержащую тот или иной белок (МПЖ, молоко и др.)

Посевы в МПЖ культивируют 5…7 суток при комнатной температуре, так как желатин расплавляется в термостате. Микробы, обладающие протеолитическими свойствами, разжижают желатин. Многие протеолитические микроорганизмы дают разный характер разжижения: послойное (идущее ровно, сверху вниз), воронкообразное, кратерообразное, реповидное, в форме чулка и т.д.; микроорганизмы, не обладающие протеолитической способностью, дают в МПЖ рост без разжижения желатина.

Для обнаружения сероводорода делается посев уколом (внутрь столбика) по стенке в агар с ацетатом свинца (МПА с 5% пептона и 0,25% ацетата свинца) или в пробирку с МПБ, в которую под пробку над средой помещается полоска стерильной фильтровальной бумаги, пропитанной раствором ацетата свинца. Если исследуемая культура при разложении белка выделяет сероводород, то появляется темно-бурое окрашивание (почернение) по месту укола в плотной среде или на фильтровальной бумажке (в МПБ).

Определение аммиака начинают с того, что под пробирку с бульонной культурой помещают розовую лакмусовую бумажку, культуру термостатируют при 370С в течение 1…3 суток. При наличии аммиака лакмусовая индикаторная бумажка приобретает синюю окраску.

Редуцирующую способность определяют посевом культуры на молоко с метиленовым синим. К стерильному молоку добавляют по капле 1%-ный водный раствор метиленового синего до голубого окрашивания. После культивирования засеянного материала бактерии, обладающие редуцирующей активностью, обесцвечивают лакмусовое молоко (под редукцией понимают химический процесс, заключающийся в отщеплении от вещества кислорода или присоединении к нему водорода).

Для определения каталазы в 3…5 суточную бульонную культуру, выращенную в пробирке, вносят 1 см3 3%-ного раствора пероксида водорода. При наличии фермента каталазы обнаруживают обильное выделение пузырьков отщепленного кислорода, т.е. образуется так называемая «пенистая шапка».

**2.2.6 Приготовление бактериальной суспензии**

В качестве источника углерода, используемого прокариотическими микроорганизмами в конструктивно-энергетическом обмене является жир и СПАВ. Приготовленную синтетическую среду подвергаем дробному автоклавированию (1; 0.5; 0.5 МПа) в течение 30 мин. По истечении данного времени, среды разливали в стерилизованные конические колбы по 50 см3.

Для получения биомассы исследуемой культуры микроорганизмов, выделенной в первой серии эксперимента, делаем посев на скошенный агар.

Подготовленные таким образом культуры инкубируем в термостате 24 ч при температуре (40±0,5)°С, по окончании чего в пробирки с микроорганизмами вводили 5 см 3 соответствующей жидкой синтетической среды, осуществляя процесс механического воздействия. Приготовленную таким образом бактериальную суспензию вносим в колбы, содержащие по 50 см3 соответствующей синтетической среды. Культивирование микроорганизмов проводили в течение различного времени при температуре (40±0,5)°С при переменном механическом воздействии, осуществляемом на Shaker Type, с частотой колебаний 250 об/мин, амплитудой 6 по 2 ч в сутки.

**2.2.7 Определение мутности**

Мутность определяют фотометрическим способом на приборе КФК-2-УХЛ-4.2 при D2540 и толщине поглощаемого слоя 30 мм. Стандартным раствором является дистиллированная вода.

**2.2.8 Высаливание фермента**

В колбу отбирают 50 см3 бактериальной суспензии, добавляют 30% от ее массы сульфата аммония, перемешивают. Раствор и образующийся осадок переносят в патроны и устанавливают в центрифугу марки ЦЛН-2. Продолжительность вращения 15 мин со скоростью 5000 об/мин. После чего образовавшийся осадок собирают в бюкс.

**2.2.9 Биуретовый метод по Ярош**

Метод используется для определения раствора белков с концентрацией от 0,04 до 1,6 мг/см3.

В пробирку наливают 2,4 см3 раствора мочевины, 0,1 см3 раствора белка и 2,5 см3 биуретового реактива. Смесь хорошо перемешивают и пробирки помещают в водяную баню или в термостат при 400С на 10 мин. Затем их охлаждают до 200С. Через 30 мин после добавления биуретового реактива раствор колометрируют при длине волны 540 нм. Количество белка находят по калибровочной кривой, составленной по яичному альбумину (рис. 1).

Для построения калибровочной кривой готовят исходные водные растворы с содержанием 15,20,25,30,35,40 и т.д. мг белка в 10 см3. Из полученных растворов отбирают в пробирки по 0,1 см3, добавляют 2,4 см3 раствора мочевины и 2,5 см3 биуретового раствора и ведут определений описанным выше методом.

**2.2.10 Определение активности липазы (модифицированный метод Ота, Ямада)**

За единицу ферментативной активности липазы принимают такое количество фермента, которое освобождает 1 мкмоль олеиновой кислоты из 40%-ной эмульсии оливкового масла при рН 7,0 и t=37°С в течение 1 ч.

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

Для проведения этого анализа необходимы следующие реактивы: раствор оливкового масла (субстрат), 2%-ный раствор поливинилового спирта, 1н раствор соляной кислоты, 0,05н раствор щелочи, фосфатно-цитратный буфер с рН 7,0, 1%-ный раствор фенолфталеина, 90%-ный раствор спирта, 1%-ный раствор фермента.

Приготовление субстрата. 100 см3 оливкового масла смешивают со 150 см3 2%-ного раствора поливинилового спирта в эмульсаторе. Полученную эмульсию выдерживают на льду в течение 60 мин. Если расслаивания не наблюдается, субстрат пригоден к использованию.

Приготовление раствора поливинилового спирта. 20г спирта помещают в мерную колбу на 1 дм3 и добавляют 800 см3 дистиллированной воды. Суспензию выдерживают в течение 30 мин при комнатной температуре, затем добавляют 0,5 см3 1н раствора соляной кислоты и непрерывно перемешивают при температуре 80–90°С в течение 1 ч. Затем раствор охлаждают, доводят до рН 7,0 раствором щелочи, объем доводят до 1 дм3 дистиллированной водой и полученный раствор фильтруют.

5 см3 эмульсии – субстрата и 4 см3 буфера с рН 7,0 помещают в колбу на 100 см3, которую закрывают пробкой. Смесь выдерживают на водяной бане при температуре 37°С в течение 10 мин. Затем к смеси добавляют 1 см3 раствора фермента и хорошо перемешивают. Полученную смесь выдерживают при температуре 37°С в течение 60 мин, после чего немедленно добавляют 30 см3 этанола для прекращения реакции. Раствор титруют 0,05н раствором щелочи в присутствии 1%-ного раствора фенолфталеина до появления окраски.

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

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

Липазную активность фермента ЛС (в ед/г) определяют по формуле (1):

А ×Т

ЛС =– × 50, (1)

В

где ЛС – липазная активность фермента, ед/г;

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

Т – титр щелочи;

В-концентрация образца ферментного раствора, г/см3.

**2.2.11 Определение протеолитической активности (метод Вильштеттера и Вальдшмидт – Лейтца в модификации)**

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

Протеолитическую активность выражают количеством миллиграммов аминного азота, которое образуется при гидролизе определенного количества 5%-го раствора желатина с рН 7,3–7,5 1 см3 ферментного раствора за 1 ч при температуре 40°С. За единицу протеолитической активности принимают количество фермента, которое образует 1 см3 аминного азота за 1 ч в принятых условиях опыта.

Для проведения анализа необходимы реактивы: фосфатный буферный раствор с рН 7,3–7,5; 5%-ный раствор желатина (субстрат) – 5 г желатина предварительно замачивают в стеклянном стаканчике в 15–20 см3 дистиллированной воды в течение 20–30 мин. Набухший белок заливают 20–25 см3 буферного раствора температурой 70–80°С и тщательно перемешивают стеклянной палочкой. Растворившуюся часть сливают в мерную колбу на 100 см3 к не растворившейся части добавляют еще 20–25 см3 буферного раствора и снова переносят полученный раствор в эту же колбу. Так повторяют до полного растворения желатина. Охлажденный до 40°С раствор желатина доводят до метки буферным раствором такой же температуры.

Перед анализом раствор желатина нагревают до 40°С на водяной бане; 1%-ный спиртовой раствор тимолфталеина – 1 г кристаллического тимолфталеина растворяют в 96% спирте-ректификате в мерной колбе на 100 см3 и после растворения доводят до метки; 0,1 н раствор щелочи; 96%-ный этиловый спирт.

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

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

Расчет протеолитической активности (ПС) ведут по формуле (2):

А

ПС = –, (2)

(t ×P)

где ПС – протеолитическая 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 1 г препарата или 1 см3 жидкого ферментного препарата.

Величина А рассчитывается по формуле (3):

А = (а – ак) ×1,4 ×К, (3)

где а – количество 0,1 н раствора щелочи, пошедшее на титрование 1 см3 раствора опытного, см3;

ак – количество 0,1 н раствора щелочи, пошедшее на титрование 1 см3 контрольной пробы, см3;

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

К – поправка к титру щелочи.

**2.2.12 Определение содержания СПАВ**

Для определения содержания в сточной воде анионактивных СПАВ применяют фотометрический метод, основанный на том, что эти СПАВ образуют с метиленовым голубым комплексные ассоциаты, растворяющиеся в хлороформе с образованием синих растворов. Сам метиленовый голубой в хлороформе не растворяется.

Приготовление рабочего раствора: 10 см3 стандартного раствора разбавляют дистиллированной водой до 1 дм3.

Построение калибровочного графика: в ряд делительных воронок, содержащих 100 см3 дистиллированной воды, помещают 0; 0,5; 1,0; 2,0;…; 16,0; 20,0 см3 рабочего раствора. В каждую воронку добавляют по 10 см3 буферного раствора, перемешивают и приливают по 5 см3 нейтрального раствора метиленового голубого и по 15 см3 хлороформа, снова перемешивают в течение 2 минут.

Во второй ряд делительных воронок наливают 100 см3 дистиллированной воды и по 5 см3 кислого раствора метиленового голубого. В эти же воронки спускают отстоявшийся хлороформный слой из первого ряда воронок. В первые воронки наливают еще по 5 см3 хлороформа, взбалтывают в течении 2 минут и после отстаивания сливают хлороформные вытяжки во второй ряд делительных воронок. Эту операцию повторяют еще раз. Если хлороформ не окрашивается, значит извлечение комплекса окончено.

Содержимое второго ряда воронок взбалтывают в течении 2 минут и после расслоения спускают хлороформный слой в мерные колбы вместимостью 50 см3 через воронки с кусочками ваты для отделения возможно образовавшейся мути. В делительные воронки наливают еще по 5 см3 хлороформа, взбалтывают 2 минуты и после расслоения спускют хлороформ в мерные колбы. Эту операцию повторяют еще раз. Объем экстракта в мерных колбах доводят до метки хлороформом, перемешивают и определяют оптическую плотность окрашенных растворов на фотоколориметре с красным светофильтром (λ=650 нм) в кюветах с толщиной поглощающего слоя 20 мм.

При определении содержания анионактивного СПАВ в сточной воде 100 см3 хорошо перемешанной сточной воды помещают в делительную воронку. Если объем пробы меньше 100 см3 его доводят до 100 см3 дистиллированной водой. В делительную воронку вливают 10 см3 фосфатно-буферного раствора, 5 см3 нейтрального раствора метиленового голубого, 15 см3 хлороформа и далее все операции проводят, указанные при построении калибровочного графика.

Параллельно проводят холостой опыт со 100 см3 дистиллированной воды.

Если оптическая плотность превышает максимальное значение калибровочного графика, то отбирают аликвотную часть хлороформного экстракта и разбавляют хлороформом. Таким же образом разбавляют и раствор холостого опыта.

Калибровочный график представлен на рис. 2.

Содержание анионактивных СПАВ определяют по формуле (4):

С×1000

Х= –, (4)

V

где Х-содержание аниононактивных СПАВ, мг/см3;

С-содержание СПАВ, найденное по калибровочному графику, мг;

V – объем сточной воды, взятый для анализа, см3;

1000-перевод в дм3.

Неионогенный СПАВ реагирует с роданокобальтом аммония, образуя комплексные вещества синей окраски, растворимые в хлороформе, роданокобальтата аммония в хлороформе нерастворим. Чувствительность реакции невелика, но поскольку определяемые вещества нелетучи, возможно предварительное концентрарование путем выпаривания анализируемой воды досуха и растворением остатка в спирте и воде.

Приготовление стандартного раствора: 1 г применяемого неионогенного СПАВ растворяют в дистиллированной воде и доводят объем до 500 см3.

Построение калибровочного графика: отбирают 0; 0,5; 1; 2; 3; 4 и 5 cм3 стандартного раствора, доводят объем до 5 см3 и переносят в ряд делительных воронок вместимостью 50 см3, в которые предварительно налито по 20 см3 раствора роданокобальтата аммония. Содержимое воронки взбалтывают 1 минуту и дают постоять 5 минут. Затем прибавляют 4 см3 хлороформа, взбалтывают 1 минут и оставляют до расслаивания жидкости. Слой хлороформа сливают через воронку, в которую предварительно вкладывают кусочек ваты, пропитанный хлороформом, в калибровочную пробирку вместимостью 10 см3. Извлечение окрашенного комплекса повторяют дважды, используя порции хлороформа объемом 4 и 2 см3 и, собирая хлороформные экстракты в ту же пробирку. Пробирку опускают на 5 минут в водяную баню при температуре 200С и, если надо, доливают хлороформ до метки и перемешивают.

Оптические плотности полученных хлороформных экстрактов определяют на фотоколориметре с оранжевым светофильтром (λ=610 нм) в кюветах с толщиной поглощающего слоя 30 мм. По полученным данным строят калибровочный график зависимости оптической плотности от содержания неионогенного СПАВ.

Калибровочный график представлен на рис. 3.

Содержание неионогенного СПАВ определяют по формуле (5):

С×1000

Х= –, (5)

V

где Х-содержание неиногенного СПАВ, мг/дм3;

С-содержание неионогенного вещества, найденное по калибровочному графику, мг;

V – объем сточной воды, взятый для анализа (с учетом разбавления или упаривания), см3;

1000-перевод в дм3.

**2.2.13 Определение рН жидкости**

Для измерения рН жидкости используется цифровой ионометр И-120.2. Входное напряжение прибора 220 В, частота 50 Гц. Ионометр предназначен для измерения рН жидкой фазы, температуры, С, градиента, %.

Измерение рН проводили следующим образом: химический стакан на 50 мл наливали 35 мл жидкости исследуемого раствора, погружали электроды, снимали показания. После этого промывали дистиллированной водой и протирали фильтровальной бумагой.

**2.2.14 Качественный анализ вещества по ИК-спектрам поглощения**

При измерении ИК-спектра твердого вещества работа ведется в следующей последовательности:

– из предварительно высушенного вещества (3–5 мг) готовят суспензию в виде пасты (растирают вещество с несколькими каплями вазелинового масла);

– количественно переносят на нижнюю крышку кюветы. Кювету закрывают в держателе и устанавливают в канале спектрофотометра. Записывают спектральные вещества в диапазоне от 4200 до 1200 см-1.

**2.2.15 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 ассиметрической 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 (рис. 4).

Отбор проб методом асимметрической бахромы

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | 3′ | 1» |  |
|  | 2′ | 2» |  |
|  | 1′ | 3» |  |
|  | 3 | 1′« |  |
|  | 2 | 2′« |  |
|  | 1 | 3′« |  |

Рис. 4

**2.2.16 Определение содержания несвязанных жировых веществ в волосяном покрове и кожевой ткани**

ГОСТ 26129–84. Шкурки меховые и овчина шубная выделанные. Метод определения содержания несвязанных жировых веществ.

Навеску измельченной кожевой ткани или волоса массой 0,5–1,5 г, взвешенную с погрешностью не более 0,0002 г., помещают в бумажную или стеклянную гильзу и закрывают тампоном. Гильзу закрепляют в предварительно доведенной до постоянной массы колбе и соединяют колбу с холодильником. Через воронку с ватным тампоном, помещенную в верхнее отверстие холодильника заливают 50 см3 дихлорэтана или хлороформа, нижняя часть гильзы должна быть не расстоянии не менее 10 мм от поверхности растворителя. Колбу с растворителем нагревают на электроплитке с асбестовым покрытием или песчаной бане. Продолжительность экстрагирования при анализе кожевой ткани – 45 мин., при анализе волоса – 15–20 мин. Растворитель должен постоянно кипеть и, охлаждая и стекая с холодильника, попадать в центр гильзы. Растворитель отгоняют холодильника, попадать в центр гильзы. Растворитель отгоняют и колбу с жировыми веществами доводят до постоянной массы в сушильном шкафу при температуре 128–1300С. Продолжительность 1-ой сушки – 30 мин., последних по 15 мин.

При определении несвязанных жировых веществ гравиметрическим методом массовую долю жировых веществ (Х) в% вычисляют по формуле (6):

m-m1

Х= – × 100, (6)

m2

где Х – массовая доля жировых веществ, %;

m – масса колбы с экстрагированными жировыми веществами, г;

m1 – масса пустой колбы, г;

m2 – масса навески кожевой ткани или волоса, г.

**2.2.17 Определение прочности связи волоса с кожевой тканью**

Образец размером 100×25 мм, вырезанный из огузочной части овчины, отмывают в проточной воде, отжимают и разрезают на ремешки размером 25×10 мм. В середине ремешка ограничивают полоску волоса, равную 5 мм. Это достигается путем применения специальной вилки с двумя параллельными иглами, находящимися на расстоянии 5 мм. Вилку вдвигают в волосяной покров как можно ближе к кожевой ткани и ограничивают полоску волоса шириной 5 мм. Перед испытанием ремешки выдерживают в воде при комнатной температуре с добавлением кальцинированной соды из расчета 5 г/дм3. После обводнения образца удаляют избыток влаги фильтровальной бумагой и приступают к испытанию.

**2.2.18 Определение показателя белизны волосяного покрова меховой овчины**

Показатель белизны волосяного покрова определяют на спектроколориметре «Пульсар». Для проверки работоспособности прибора необходимо:

1) включить прибор и нажать кнопку «СБРОС», на дисплее прибора высветятся символы «Ч» и «С», на индикаторах режима и вывода – «0»,

2) нажать на кнопку «ПУСК», через 10 с на левом и среднем индикаторах дисплея высветятся символы «Б» и «С» соответственно,

3) нажать на кнопку «ПУСК», через 10 с на левом индикаторе дисплея символ «Б» заменится на «I», соответствии индикации на дисплее прибора значениям индикатора проверяется по таблице.

Для смены значения цифр на индикаторе режима необходимо нажать на кнопку «УСТ.РЕЖИМА».

4) Перед измерениями прибор необходимо прогреть в течение 30 минут.

Порядок измерения:

1) Установить на индикаторе режима цифру «2», на индикаторе вывода цифру «3».

2) Установить на место установки отражающего образца измеряемый образец и запустить прибор.

3) По окончании измерения на индикаторах дисплея высветятся значения координат цветности, Х, Y и яркость измеряемого образца.

**2.2.19 Определение токсичности сточных вод**

В качестве тест-объектов можно использовать следующие организмы: дафнии (Daphnia magna Straus); большой прудовик (Limnaca stagnalis) и гуппи (Lebistes reticulatus). Установление уровня токсического загрязнения (УТЗ) водных масс по данным биотестирования на дафниях представлены в табл. 2.

Таблица 2. Установление УТЗ водных масс по данным биотестирования на дафниях

|  |  |
| --- | --- |
| Показатель биотестирования | УТЗ (класс) |
| Гибель (мгновенная или в течение 1–2 ч) тест-культуры дафний | Гипертоксичный (Г-Т) |
| Гибель свыше 50% в течение 24 ч., или не менее 50% в течение 48 ч. | Политоксичный (П-Т) |
| Показатель биотестирования | УТЗ (класс) |
| Поведенческие реакции (вращение вокруг своей оси, нарушение координации движения, иммобилизация) | Альфа-мезо-токсичный (α-М-Т) |
| Гибель менее 50% в течение 48–96 часов. Слабовыраженные поведенческие реакции. | Бетта-мезо-токсичный (β-М-Т) |
| Смертность не выше 10%. Нарушение репродуктивного цикла, эмбрионального развития, линьки при хронических опытах. | Олиготоксичный (О-Т) |

К первому классу – весьма остротоксичному – относится вода, если все организмы погибают в ней в течение суток или менее; ко 2 классу – вода остро токсична, все организмы погибают в течение пяти суток; к 3 классу – токсичному, если в течение пяти суток гибель дафний достигает 70–100%; к 4 классу – мало токсичному, если гибель дафний не превышает 30%; к 5 классу – условно нетоксичному, если по истечении 5 суток все организмы выживают и по внешнему состоянию или поведению не отличаются от контрольных.

**Выполнение работы.** В сосуд с очищенной исследуемой жидкостью запускают тест-объект и проводят визуальную оценку его физического состояния в течение 5 суток. На основании полученных результатов проводится оценка токсичности воды. В качестве критерия токсичности используется параметр выживаемости тест-объекта.

2.2.20 Обработка результатов эксперимента

Обработка результатов эксперимента производилась по программе «OTSEV-12». Этот метод основан на рассмотрении стандартного отклонения. По программе можно обрабатывать результаты эксперимента при количестве данных от 3 до 20. Это обусловлено тем, что в подпрограммах приведены табличные значения критерия Стьюдента от 3 до 20. В программе используются табличные значения критерия Стьюдента. В программе возможна проверка грубых ошибок только двух значений (максимального и минимального). Расчет по программе «OTSEV-12» производится по формулам, приведенным ниже.

Среднеквадратичное отклонение определяют по формуле (7):

(∑ хi2) – [(∑xi)2 / N]

σ = ––––––––––––––, (7)

N – 1

где σ – среднеквадратичное отклонение;

хi – измеренная величина;

N – количество параллельных опытов.

Коэффициент вариации определяется по формуле (8):

σ

Кв = –––––––––– × 100, (8)

х

где Кв – коэффициент вариации, %;

σ – среднеквадратичное отклонение;

х – среднее арифметическое значение.

Относительная погрешность определяется по формуле (9):

Е = Е1 – Е2, (9)

где Е – относительная погрешность, %;

Е1 – систематические погрешности измерений, %;

Е2 – случайные погрешности измерений, %.

Относительная ошибка измерения определяется по формуле (10):

σ0 × tт

Δ = –––––––––, (10)

Х

где Δ – относительная погрешность, %;

σ0 – стандартное отклонение среднего;

Е – погрешность измерения, %;

tт – табличное значение коэффициента (критерия) Стъюдента.

Доверительный интервал определяется по формуле (11):

μ = σ0 × tт (11)

где μ – доверительный интервал;

σ0 – стандартное отклонение среднего;

tт – табличное значение коэффициента (критерия) Стъюдента.

**3. Экспериментальная часть**

Одной из важных проблем мехового производства является снижение загрязнения сточных вод синтетическими поверхностно-активными веществами. Поступая в нативные водные объекты, СПАВ изменяют кислородный режим вод, вызывая гибель организмов. Решение этой проблемы особенно актуально в Байкальском регионе.

В настоящее время наиболее перспективным является использование биотехнологических методов, основанных на применении микроорганизмов с заданными свойствами, что позволяет уменьшить уровень техногенного воздействия на окружающую среду.

Высокая степень загрязнения сточных вод после процесса обезжиривания меховой овчины объясняется высокой начальной концентрацией СПАВ – 8 г/дм3 и формальдегида, являющегося токсичным и для человека, и для гидробионтов.

Одним из способов, позволяющих снизить уровень токсического загрязнения сточных вод, является совершенствование технологического процесса путем разработки новых обезжиривающих составов, позволяющих решить данную проблему при сохранении качества готовой продукции.

В связи с этим целью данной работы являлась разработка условий проведения совмещенного эмульсионного и микробиологического обезжиривания, основанного на применении концентрированного ферментного препарата, продуцируемого культурами рода Listeria. Исследуемые культуры были выделены из сточных вод после эмульсионного обезжиривания меховой овчины. Для получения ферментного препарата проведена его адаптация на синтетических средах, где в качестве единственного источника углерода были использованы синтетические поверхностно-активные вещества. В синтетическую среду вводили СПАВ различной химической природы: анионактивные – Гамма, De-sol-A, неионогенные – Превоцелл W-OF-7, Wetter HAC.

**3.1 Изучение морфолого-физиологических и культуральных свойств микроорганизмов**

Целью данного этапа эксперимента являлось выделение, изучение свойств микроорганизмов и определение их видовой принадлежности. Исследуемые культуры были выделены из сточной воды после эмульсионного обезжиривания меховой овчины. Изучаемые культуры были обозначены номерами 3,7, F, G, I, I′. Получение чистых культур прокариотических микроорганизмов проводили путем изолирования отдельных клеток на плотной питательной среде, используя метод посева штрихом и метод разведения. Для получения чистых культур методом посева штриха, петлей с культурой зигзагом наносили на поверхность среды. Синтетическую среду готовили в соответствии с п. 2.2.1. с иcпользованием в качестве источника углерода СПАВ «Превоцелл-W-OF-7» в количестве 1 г/л. Для получения единичных колоний методом разведения в чашки Петри вносили 0,1 см3 разведенной культуры и равномерно распределяли с помощью стеклянного шпателя по всей поверхности. Чашки Петри с культурами инкубировали в перевернутом виде в термостате в течение 24 ч при постоянной температуре (38±0,5)0С.

В ходе эксперимента готовили синтетические среды с содержанием импортного и отечественного агар-агара в соотношении 1:1 и 1,5:0,5. Агар-агар отечественного производства содержит большое количество органической примеси, которая служит дополнительным источником питания микроорганизмов, а в импортном – практически отсутствуют. Для восстановления жизненно важных функций и определения морфолого-физиологических свойств микроорганизмов методом 10-ти кратного разведения культуры пересевали на чашки Петри, где в качестве питательной среды использовали мясопептонный агар (МПА).

Синтетические среды с содержанием 1:1 и 1,5:0,5 импортного и отечественного агар-агара обозначили буквами В и С соответственно, а мясопептонный бульон-А. Изменение культуральных свойств в зависимости от вида питательной среды представлено в табл. 3.

Как видно из данных, представленных в табл. 3, с изменением состава синтетической среды (с В на С) колоний практически не изменяется и колеблется от белого до желтоватого. Форма колоний – круглая, но с уменьшением содержания органической примеси у культур I и I’ форма оставалась без изменений, но с валиком по краям и фестончатым краем соответственно. Профиль и поверхность колоний не менялись. У культур I и I’ размеры переходят от точечных до средней величины. А также структура колоний I’ переходит из однородной (среда В) в мелкозернистую (среда С).

На МПА культуры имели, в основном, круглую форму, но с разнообразными краями – гладкими (колонии 3, F, G) и ворсистыми (7, I, I’). Поверхность выросшие культуры имели гладкую, за исключением F, I (шероховатая). Все колонии имели точечные размеры (диаметр менее 1 мм), кроме I (средней величины d>1 мм). Цвет изменяется от белого до желтого. Структура колоний 3,7, G была однородной, а у культур F, I, I’ – мелкозернистой. Из табл. 3 видно, что с изменением соотношения агар-агара импортного и отечественного производства lg КОЕ снижается. Так, например, для культуры 3 данный показатель уменьшается с 7,62 до 6,48. На среде МПА максимальный lg КОЕ наблюдается у культуры 3 (27,82), а минимальный – у I’ (18,04).

Далее определяли такие морфолого-физиологические признаки микроорганизмов, как спорообразование, подвижность, разжижение желатина, наличие сероводорода, аммиака, каталазы, а также редуцирующую способность. Данные определений представлены в табл. 4.

Далее провели исследования колоний на тинкториальную способность (окраска по Граму и подвижность). Окраска по Граму является дифференциально-диагностической и зависит от содержания в клеточной стенке гликолипида муреина, представляющего собой гетерополимер, который в свою очередь состоит из чередующихся остатков N-ацетилглюкозоамина и N – ацетилмурамовой кислоты и пептидов. Грамположительная окраска указывает на наличие небольшого количества полисахаридов, липидов и белков и характерна для всех выделенных культур. Исследование подвижности показало, что для микроорганизмов типа 3,7, I характерен лофотрихиальный тип движения, культуре F – перетрихиальный, G – монотрихиальный. А для культуры I’ характерен как монотрихиальный, так и лофотрихиальный тип движения.

Протеолитические свойства микроорганизмов изучали посевом в мясопептонный желатин (МПЖ) согласно п. 2.2.5. Выделенные культуры, кроме F, обладают протеолитическими свойствами, т. к. разжижают МПЖ. Для обнаружения сероводорода делали посев уколом пристеночно в агар-агар с уксуснокислым свинцом (п. 2.2.5.1.). Если культура при разложении белка выделяет сероводород, то появляется темно-бурое окрашивание (почернение) по месту укола в плотной среде. Культуры 3, F, I выделяют сероводород, а остальные – нет. Ни одна культура не выделяет аммиак, определение которого проводили в соответствии с п. 2.2.5.2. при наличии фермента каталазы при действии перекиси водорода обнаруживают обильное выделение пузырьков отщепленного кислорода, т.е. образуется «пенистая шапка». Каталаза присутствует во всех выделенных культурах. Редуцирующей способностью (обесцвечивание молока с метиленовым синим) обладают все культуры, за исключением I.

На основе исследования свойств микроорганизмов определили их видовую принадлежность /53/. Бактерии рода Listeria представляют собой короткие палочки правильной формы с закругленными краями. Грамположительные, неспорообразующие, каталазоположительные. Следовательно, культуры 3, 7, G, I’ можно отнести к данному роду, т. к. они имели форму коротких палочек, окрасились в фиолетовый цвет (грамположительные) и не образовывали при определении каталазы «пенистую шапку». Данные микроорганизмы широко распространены в окружающей среде, некоторые виды патогенны для человека и животных.

Культуру F можно отнести к роду Brochotrix. Данные микроорганизмы имеют палочки правильной формы в цепочках, грамположительные и каталазоположительные. Эти признаки наблюдались при изучении свойств культуры F. Данные организмы широко распространены в природе.

Бактерии рода Bacillus имеют форму прямых палочек с закругленными концами, грамположительные, подвижные и образующие овальные эндоспоры, каталазоположительные. Как видно из данных табл. 4, все эти признаки относятся к культуре I. Данные микроорганизмы обнаруживаются в разнообразных местообитаниях, некоторые виды патогенны для позвоночных и беспозвоночных.

Липолитические свойства микроорганизмов определяли посевом в бульон Штерна, где в качестве единственного источника углерода использовали оливковое масло с концентрацией 1 см3/100 см3 бульона. Бактерии, обладающие липолитическими свойствами, при ферментации оливкового масла извлекают из него альдегиды, подкисляя среду, при этом окраска бульона переходит из золотисто-желтой в розовую. Стерильный бульон Штерна разливали в пробирки по 10 см3 в каждую и вносили исследуемые культуры. Пробирки с микроорганизмами термостатировали при температуре (38±0,5)0С. В течение 120 ч проводили визуальные наблюдения за изменением физических свойств бульона Штерна, которые выражались в образовании хлопьев, а также в изменении цвета и прозрачности. В качестве контрольного варианта использовали состав, включающий в себя бульон Штерна без введения микроорганизмов. Результаты наблюдений представлены в табл. 5.

Таблица 5. Влияние типов бактерий на свойства бульона Штерна

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Тип колоний | Показатели качественного состояния бульона | Характеристика изменения качественного состояния бульона через | | | | | |
| (род) | Штерна | 0 ч | 24 ч | 48 ч | 72 ч | 96 ч | 120 ч |
| Контрольный вариант | Цвет бульона | золот-желт | золот-желт | золот-желт | золот-желт | золот-желт | золот-желт |
| Наличие хлопков | - | - | - | - | - | - |
| Ширина жирового кольца, мм | 2,0 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 |
|  | Наличие помутнения | - | - | - | - | - | - |
|  | рН | 6,5 | 6,5 | 6,5 | 6,5 | 6,5 | 6,5 |
| Listeria | Цвет бульона | золот-желт | золот-желт | золот-желт | золот-желт | с роз.  оттенком | розовый |
| sp I | Наличие хлопков | - | - | - | - | - | - |
|  | Ширина жирового кольца, мм | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0  част разрушение  кольца | 2,0  част разруш-ие  кольца |
|  | Наличие помутнения | - | +/- | +/- | +/- | +/- | +/- |
|  | рН | 6,5 | 6,5 | 6,0 | 5,5 | 5,5 | 5,5 |
| Listeria | Цвет бульона | золот-желт | золот-желт | золот-желт | золот-желт | золот-желт | золот-желт |
| sp 3 | Наличие хлопков | - | - | - | - | - | - |
|  | Ширина жирового кольца, мм | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 |
|  | Наличие помутнения | - | + | + | + | + | + |
|  | рН | 6,5 | 6,5 | 7,0 | 7,0 | 7,5 | 7,5 |

Как видно из данных, представленных в табл. 5, практически для всех типов микроорганизмов в процессе культивирования не наблюдалось образование хлопьевидного осадка, за исключением культур 7, G. Для них характерно появление хлопков вследствие продуцирования экзоферментов в последние 72–120 ч. Использование оливкового масла бактериями в качестве источника энергии и углерода подтверждалось переходом окраски из золотисто-желтой в розовую, за счет образования в результате деструкции жировых веществ, альдегидов и жирных кислот, что вело к понижению величины рН. Данная зависимость наблюдалась для культур I′, 7, G через 72–96 ч культивирования. Изменение прозрачности бульона, в основном, через 48 ч у всех культур, кроме контрольного варианта, свидетельствовало об интенсивном росте и развитии микроорганизмов.

Таким образом, в результате проведения данной части дипломной работы были исследованы морфолого-физиологические и культуральные свойства микроорганизмов и определена их видовая принадлежность. Так культуры 3,7, I′ относятся к роду Listeria, F- к роду Brochotrix, I – к Bacillus.

**3.2 Влияние условий культивирования на свойства ферментного препарат а, продуцируемого культурой рода Listeria**

Целью второго этапа эксперимента являлось определение оптимального времени культивирования для получения ферментного препарата с заданными свойствами.

На основании первой серии эксперимента для дальнейшего исследования были выбраны три культуры рода Listeria типа 3, 7, I, а также среды, содержащие следующие виды СПАВ: Превоцелл W-OF-7, Wetter HAC, Гамма и De-sol-A. Для получения биомассы исследуемых культур микроорганизмов, активизированных в первой части, готовили бактериальные суспензии. Для этого каждую выросшую культуру не скошенном агаре переносили в колбы Эрленмейера на 250 см3, содержащие по 200 см3 жидкой синтетической среды, приготовленной в соответствии с п. 2.2.1. Культивирование проводили при (380,5)0С при переменном механическом воздействии, осуществляемом на «Shaker Type» с частотой колебания 250 об/мин, с амплитудой 6 по 2 часа в сутки.

Через каждые 24 часа культивирования снимали следующие характеристики: подсчет величины КОЕ (п. 2.2.2), определение рН (п. 2.2.13), кислотности, мутности (п. 2.2.7), а также концентрации анионактивных и неионогенных СПАВ согласно п. 2.2.12.1 и п. 2.2.12.2. Для определения концентрации белка по Ярош, липолитической и протеолитической активностей брали сырую поверхностную культуру, которую получали путем высаливания NH4(SO4)2 из пробы с расходом 30% от объема, согласно п. 2.2.8. Затем отделяли фугат от осадка. Оставшуюся часть (50 мл) выпаривали в фарфоровой чашке и готовили пробу для качественного анализа вещества по ИК-спектрам поглощения в соответствии с п. 2.2.14. Осадок растворяли в 25 мл дистиллированной воды и проводили определение протеолитической, липолитической активностей и концентрации белка. Данные результатов исследования для культур рода Listeria sp 3 приведены в табл. 6, типа 7 – в табл. 7, типа I – в табл. 8.

Степень вовлечения в конструктивный и энергетический обмен оценивали по изменениям интенсивности по ИК-спектров и концентрации СПАВ.

Как видно из данных, представленных в табл. 6–8 и на рис. величина КОЕ (колонии образующие единицы) для сред с Превоцелл W-OF (культура рода Listeria sp 3, I), Wetter HAC (3,7, I) начинала увеличиваться с начала культивирования, достигая максимума к 48 ч. Так для среды, содержащей Превоцелл W-OF-7 и культуру Listeria sp 3 lg КОЕ=3,05 и увеличивается до lg КОЕ=4,60. Затем данная величина начинала уменьшаться до lg КОЕ=3,70. Вероятно это можно объяснить тем, что в начале культивирования (0 ч) наблюдалось увеличение числа клеток в результате возрастания частоты клеточного деления, что соответствовало лаг-фазе. Вторая логарифмическая фаза характеризуется постоянной продолжительностью существования возникающих друг за другом клеток. Затем наблюдался переход в стационарную фазу размножения (достижение максимума lg КОЕ). После наступала фаза отмирания, когда биомасса клеток уменьшается за счет автолитических процессов и лимитирования по субстрату для Превоцелл W-OF-7 (культура Listeria sp 3) до lg КОЕ=3,70. Увеличение величины КОЕ также подтверждается возрастанием мутности. Для Превоцелл W-OF-7 (культура типа 3) и Wetter HAC (культура типа 7) мутность повышается с 0,04 до 0,17 и с 0,035 до 0,22 соответственно. Lg КОЕ увеличивается до определенного момента, а затем уменьшается, а мутность постоянно возрастает. Это можно объяснить увеличением концентрации белка с 0 до 1,55 г./дм3 – для среды, содержащей Превоцелл W-OF-7 (культура типа 3) и с 0 до 1,05 г./дм3 – для cреды, содержащей Wetter HAC (культура типа 7).

Для таких СПАВ, как Гамма, De-sol-A и Превоцелл W-OF-7 (культура Listeria sp 7) роста колоний не наблюдалось, но о развитии прокариотических организмов свидетельствует увеличение показателя мутности и концентрации белка. Также был вычислен индекс скорости размножения – и время регенерации-g.

Индекс скорости размножения рассчитывали по формуле (12):

Ln (N/N0)

= –––––––––––––––––––, (12)

t

где -индекс скорости размножения;

N0 - число клеток в нулевой точке отсчета времени;

N-число клеток в любое, более позднее время;

t – время, ч.

Время регенерации определяли по формуле (13):

log N-log N0

g= ––––––––––––––––––, (13)

log 2

где g-время регенерации;

N-число клеток в нулевой точке отсчета времени;

N0 – число клеток в любое, более позднее время.

Как видно из данных табл. 6–8, максимальные удельная скорость размножения и время регенерации характерны для состава, содержащего Wetter HAC (культура типа 3), и составляет 0,1341 и 4,65 соответственно при 24 ч культивирования. В основном, после 48 ч культивирования наблюдается снижение данных показателей до отрицательной величины. Это указывает на то, что оптимальным временем культивирования является 48–72 ч. Практически во всех случаях наблюдается увеличение показателей активной реакции среды и кислотности. Увеличение рН, вероятно, связано с тем, что для синтеза аминокислот, которые являются составляющими ферментов, необходим азот. Свободный азот микроорганизмы способны фиксировать из воздуха и прежде, чем такой окисленный элемент станет составной частью аминокислот, он должен быть восстановлен. Восстановление азота до аммиака происходит с участием АТФ, кроме того, в состав сред входит NH4Cl, который также участвует в образовании аминокислот, и образующийся аммиак различными путями включается в состав органических соединений и прежде всего в состав аминокислот. И на этом этапе образования аммиака и происходит увеличение рН.

Для таких СПАВ, как Гамма (культура Listeria sp 7) и De-sol-A (культуры типа 7 и I) после 72 ч культивирования наблюдается незначительное понижение рН с 5 до 4,95, с 4,5 до 4,4 и с 4,45 до 4,4 соответственно. Это, вероятно, связано с тем, что протекала деструкция жировых веществ до глицерина и жирных кислот, которые и способствовали созданию кислой среды. Химизм этого процесса можно представить следующим образом:

О

 //

СН2-С

\\

R

О СН2-ОН

 // 3 ОН – ⏐

CН-С –→ СН-ОН + RCOO-

\\ ⏐

R СН2-ОН

O

 //

CH2-C

\\

R

Источником углерода в синтетических средах для культур рода Listeria sp являлись СПАВ различной химической природы. Использование данных ингредиентов в качестве питательного субстрата подтверждалось уменьшением концентрации СПАВ в процессе культивирования.

На основании данных, представленных в табл. 6–8 можно сделать вывод о том, что концентрация исследуемых СПАВ уменьшается. Максимальная степень деструкции была характерна для сред, содержащих Превоцелл W-OF-7. Концентрация за 96 ч уменьшилась с 0,47 до 0,09 г./дм3 – для культуры Listeria sp 3, то есть на 81%, с 0,48 до 0,06 г./дм3 (культура типа 7) – на 88%, с 0,46 до 0,06 г./дм3 (культура типа I) – на 87%. Минимальная степень деструкции наблюдалась для составов, содержащих Гамма и De-sol-A и составила 31,3 и 65,3% соответственно. Вероятно, такое небольшое уменьшение концентрации СПАВ связано не только с вовлечением их в клеточных метаболизм, но и с частичной их адсорбцией на поверхности стенок сосудов и клеток микроорганизмов.

Интенсивное вовлечение неионогенного СПАВ Превоцелл W-OF-7 в метаболические процессы, возможно, связано с тем, что он имеет как гидрофобную, так и гидрофильную группу из органических веществ, что определяет принципиальную возможность окисления с обоих концов молекулы. Биохимический распад НПАВ происходит путем карбоксилирования конечной метильной группы алкильной цепи с последующим ее окислением и гидролизом полиэтиленгликолевой цепи.

Для подтверждения полученных данных был проведен качественный анализ деструкции СПАВ с использованием спектрофотометра ИКС-29 производственного объединения ЛОМО. Для этого из приготовленной пробы готовили суспензию в виде пасты с несколькими каплями вазелинового масла, количественно переносили в нижнюю крышку кюветы и устанавливали в канале спектрофотометра.

На спектрограммах, представленных на рис. для Превоцелл W-OF-7, Wetter HAC, Гамма, De-sol-A в области валентных высоких колебаний средней интенсивности появлялись полосы поглощения в диапазоне 2940–2910 см-1, 3000–2850 см-1, которые можно отнести к валентным колебаниям алкильной части молекулы, что по литературным данным составляет 3350–3200 см-1. Полосы поглощения 1650–1300 см-1 можно охарактеризовать наличием оксиэтильной части молекул, что по литературным данным соответствует 1460–1000 см-1.

Как видно из рис. и рис. (приложение 2) для всех СПАВ, за исключением Превоцелла W-OF-7 (культура рода Listeria sp I и 7) и Гаммы (Listeria sp I) через 48 ч культивирования наблюдается увеличение пиков, а затем к 96 ч – сглаживание пиков. Это объясняется, вероятно, тем, что на начальном этапе в результате деструкции образуются какие-либо вещества, затем СПАВ начинают вовлекаться в конструктивно-энергетический обмен. Наиболее полно утилизировался СПАВ De-sol-A культурой рода Listeria sp 7, его молекула подвергалась деградации сразу с 2-х сторон – с оксиэтильной цепи и углеводородного радикала. Для СПАВ, которые являлись исключением наблюдается увеличение пиков на протяжении 96 ч.

Как видно из данных табл. 6–8, на протяжении всего периода культивирования наблюдается увеличение протеолитической активности, которая указывает на разрушение белка. Так, минимальная величина протеолитической активности после 96 ч культивирования была характерна для составов с Wetter HAC (культура типа 7) и Гамма (культура типа I) и составила по 12,88 ед/г каждая. Постепенно микроорганизмы начинали вовлекать в конструктивно-энергетический обмен и шерстный жир, который входил в состав жидких синтетических сред, поэтому ферментный препарат обладал и липолитической активностью. Так, максимальное значение данной величины наблюдалось для сред, содержащих в своем составе Wetter HAC (культура рода Listeria sp 7) – 85,71 ед/г, Гамма (культура типа 3) – 76,0 ед/г и 57,14 ед/г – для Превоцелл W-OF-7 (культура типа I). Повышение липолитической активности наблюдалось на конечной стадии развития прокариотических организмов, так как в это время жировые вещества наиболее полно вовлекаются в метаболические процессы. Преобладание липолитической активности над протеолитической составило 3–4 раза.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что максимальная степень деструкции характерна для СПАВ типа Превоцелл W-OF-7 (85,3%), Wetter HAC (79,3%). Максимальная липолитическая и минимальная протеолитическая активности наблюдались у экзофермента, продуцированного на среде, содержащей СПАВ Гамма (культура типа 3) – 76,0 ед/г и 13,72 ед/г соответственно, у белка, продуцированного Wetter HAC (культура типа 7) – 85,71 и 12,88 ед/г, а также у белка, продуцированного Превоцелл W-OF-7 (культура типа I) – 57,14 и 13,16 ед/г. У выше перечисленных СПАВ наблюдается и максимальная концентрация белка. Следовательно, у ферментных препаратов, продуцируемых на синтетических средах культурами рода Listeria sp 3,7, I, содержащих такие СПАВ, как Гамма, Wetter HAC и Превоцелл W-OF-7. Данные СПАВы наиболее полно вовлекались в конструктивно-энергетический обмен и были использованы для дальнейших исследований при разных значених активной реакции среды.

Для дальнейшего эксперимента готовили среды, содержащие в качестве источника углерода Превоцелл W-OF-7, Wetter HAC, Гамма и создавали различные рН (кислая, нейтральная и щелочная). В среду с Превоцелл W-OF-7 вводили со скошенного агара культуру рода Listeria sp I, c Wetter HAC – культуру типа 7 и с Гамма – культуру типа 3. Культивирование проводили при температуре (380,5)0С при переменном механическом воздействии на «Shaker Type» с частотой колебания 250 об/мин и амплитудой 6 в течении 72 ч. Через каждые 24 ч снимали следующие показатели: КОЕ, рН, кислотность, мутность, концентрацию белка (г/дм3), а также липолитическую и протеолитическую активности. Данные определений представлены в табл. 9.

Как видно из табл. 9, величина КОЕ во всех случаях увеличивается. На это указывает увеличение мутности в кислой и нейтральной средах. В щелочной среде роста для всех СПАВ и культур не налюдается, но о развитии микроорганизмов говорит резкое повышение мутности после 48 ч культивирования в 2–3 раза и увеличение концентрации белка с 0,36 до 1,57 г./дм3 – для Превоцелл W-OF-7, с 0,18 до 0,55 г./дм3 – для Wetter HAC и с 0,22 до 0,53 г./дм3 – для Гамма. Максимальная концентрация белка наблюдается при рН=7,35 у cреды, содержащей в качестве источника углерода Превоцелл W-OF-7 (2,85 г./дм3) и при рН=4,85 у cреды с Wetter HAC (2,69 г./дм3).

В кислой и щелочной средах, частично в кислой, средах наблюдается уменьшение величины активной реакции среды, что связано с деструкцией жировых веществ с образованием жирных кислот.

Минимальное значение протеолитической активности характерно для среды, содержащей в своем составе Wetter HAC при рН=4,85 (7,96 ед/г) и Превоцелл W-OF-7 при рН=7,35 (7,13 ед/г) после 72 ч культивирования. В щелочной среде данный показатель во всех случаях был практически одинаковый. Максимальной липолитической активностью (деструкцией жировых веществ) обладали те же СПАВ: Wetter HAC (рН=4,85), Превоцелл W-OF-7 (рН=7,35 и рН=8,55) и ее значение составило 85,50; 89,47; 72,55 ед/г соответственно.

Таким образом, синтетическую среду, содержащую ферментный препарат, продуцируемый культурой рода Listeria sp I, и Превоцелл W-OF-7 при всех значениях активной реакции среды (рН<7, рН7, рН>7), а также Wetter HAC и ферментный препарат, продуцируемый культурой рода Listeria sp 7 при рН<7, могут быть использованы для дальнейшего проведения процесса обезжиривания.

**3.3 Изучение возможности проведения процесса обезжиривания I с применением ферментного препарата**

Целью данного этапа эксперимента было получение ферментных препаратов на средах, содержащих в качестве источника углерода СПАВ (Превоцелл W-OF-7 с рН<7, рН~7, рН>7 и Wetter HAC с рН<7) и шерстный жир, с последующим их применением для проведения процесса обезжиривания I меховой овчины.

В результате выполненных ранее экспериментов были разработаны оптимальные условия культивирования культур рода Listeria sp I и 7 c целью получения комплексного ферментного препарата с заданными свойствами. Состав синтетических сред представлен в табл. 10.

Таблица 10. Состав синтетических сред

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | Расход химматериалов, г/дм3 | |
| Компоненты | среда, содержащая | |
|  | Превоцелл W-OF-7 | Wetter HAC |
| NaH2PO4 | 1,0 | 1,0 |
| NH4NO3 | 1,0 | 1,0 |
| KCl | 0,5 | 0,5 |
| MgCl2 | 0,1 | 0,1 |
| Превоцелл W-OF-7 | 0,5 | - |
| Wetter HAC | - | 0,5 |
| Шерстный жир | 1,0 | 1,0 |

Среды культивировали в течение 72 ч при температуре (380,5)0С при переменном механическом воздействии на «Shaker Type» с частотой колебаний 250 об/мин и амплитуде 6.

В начале культивирования (0 ч) и через 72 часа (перед обезжириванием) снимали следующие показатели: рН, кислотность, мутность, концентрацию белка, КОЕ, липолитическую и протеолитическую активности, которые представлены в табл. 11.

Как видно из данных табл. 11, величина КОЕ во всех случаях возрастает, что подтверждается увеличением мутности (для Превоцелл W-OF-7 c рН=4,82 показатель мутности изменяется с 0,12 до 0,30). Увеличение КОЕ объясняется ростом числа микробных продуцентов за счет достаточного количества субстрата. Наблюдаемое уменьшение активной реакции среды и увеличением кислотности, вероятно, происходит за счет деструкции жировых веществ с образованием жирных кислот.

Таблица 11. Влияние вида СПАВ и активной реакции среды на свойства ферментного препарата, продуцированного культурами рода Listeria

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  | Синтетическая среда, содержащая | | | |
| Показатели | Время культивирования, ч | Превоцелл  W-OF-7 (рН<7) | Превоцелл  W-OF-7 (рН=7) | Превоцелл  W-OF-7 (рН>7) | Wetter HAC (рН<7) |
| рН | 0  72 | 4,82  4,75 | 7,10  6,90 | 8,70  8,40 | 4,95  4,90 |
| Кислотность, г/дм3 | 0  72 | 0,21  0,24 | 0,36  0,42 | -  - | 0,24  0,30 |
| Мутность, D2540 | 0  72 | 0,12  0,30 | 0,15  0,20 | 0,18  0,25 | 0,22  0,30 |
| Lg КОЕ | 0  72 | 3,25  3,43 | 2,95  3,76 | 3,15  4,02 | 3,12  3,98 |
| Концентрация белка, г/дм3 | 0  72 | 0,45  0,86 | 0,62  0,84 | 0,15  0,36 | 0,68  0,92 |
| Концентрация СПАВ, г/дм3 | 0  72 | 0,48  0,47 | 0,51  0,36 | 0,50  0,29 | 0,49  0,25 |
| Липолитическая активность, ед/г | 0  72 | 32,45  56,42 | 36,23  51,31 | 25,00  41,66 | 41,55  61,64 |
| Протеолитическая активность, ед/г | 0  72 | 10,22  11,15 | 9,56  10,38 | 12,09  12,98 | 8,85  9,38 |

Это связано с тем, что возрастает продуцирование ферментного препарата на промежутке времени 0–72 часа, так как данный промежуток времени соответствует логарифмической фазе развития прокариотических организмов. Возрастание липолитической и протеолитической активностей для всех составов связано с вовлечением СПАВ и жировых веществ в конструктивный и энергетический обмен.

Следующий этап эксперимента заключался в проведении обезжиривания с применением ферментных препаратов, полученных на жидких средах с Превоцелл W-OF-7 (при разных значениях рН) и с Wetter HAC (при рН<7). Овчину после процесса отмоки, проведенного по типовой методике отбирали методом асимметрической бахромы в соотвествии с п. 2.2.15. Обезжиривание проводили при жк=12, температуре (402)0С, продолжительности 45 мин и при непрерывном механическом воздействии на встряхивателе «Shaker Type-357» со скоростью 80 об/мин, амплитуде 7. В качестве контрольного варианта было проведено обезжиривание по типовой методике. Для проведения процесса обезжиривания с применением ферментного препарата, с каждым из исследуемых СПАВ с различными значениями активной реакции среды было приготовлено по 3 обезжиривающих ванны, содержащих культуральную жидкость, полученную после 72 ч инкубирования. Ванны под номерами 1,2,3 содержали ферментный препарат, продуцированный на среде, содержащей в качестве источника углерода шерстный и Превоцелл W-OF-7 с рН=4,75 с начальной концентрацией, разбавленный в 2 и 3 раза. Аналогично готовили ванны с Превоцелл W-OF-7 при рН=6,9 были обозначены номерами 4,5,6, при рН=8,40 – 7,8,9, а также с Wetter HAC (рН=4,90) 10,11,12. Ванну, приготовленную по типовой методике, обозначили номером 13.

Таблица 12. Состав обезжиривающих ванн

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Тип обезжиривающей ванны | | | | | | | | | | | | |
| Состав | Ферментный препарат, продуцированный | | | | | | | | | | | | |
|  | Превоцелл W-OF-7 (рН<7) | | | Превоцелл W-OF-7 (рН=7) | | | Превоцелл  W-OF-7 (рН>7) | | | Wetter HAC (рН<7) | | | Типовая методика |
|  | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 |
| Ферментный препарат, г/дм3 | 1,84 | 0,92 | 0,61 | 2,85 | 1,43 | 0,95 | 1,57 | 0,79 | 0,52 | 0,55 | 0,28 | 0,18 | - |
| СПАВ, г/дм3 | 0,27 | 0,14 | 0,09 | 0,36 | 0,18 | 0,12 | 0,29 | 0,15 | 0,10 | 0,25 | 0,13 | 0,08 | 8,0 |
| Формальде-гид, см3/дм3 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0,5 |
| Карбонат натрия, г/дм3 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0,5 |

До и после обезжиривания определяли концентрацию СПАВ (п. 2.2.12), рН (п. 2.2.13), кислотность, мутность (п. 2.2.7), КОЕ (п. 2.2.2), а также содержание жира в волосяном покрове и кожевой ткани (п. 2.2.16), связь волоса с кожевой тканью (п. 2.2.17), белизну (п. 2.2.18).

Таблица 13. Влияние состава обезжиривающей ванны, содержащей ферментный препарат, на свойства полуфабриката

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Тип ванны | Содержание жировых веществ, % | | Прочность связи волоса с кожевой тканью, Н | Белизна, % |
|  | в волосяном покрове | в кожевой ткани |  |  |
| 0\* | 15,22 | 22,64 | 19 | 65,5±3,9 |
| 1 | 3,32 | 17,26 | 26 | 79,7±2,5 |
| 2 | 4,12 | 17,88 | 45 | 70,9±4,9 |
| 3 | 5,65 | 18,24 | 50 | 74,9±3,4 |
| 4 | 3,05 | 17,15 | 25 | 79,5±2,6 |
| 5 | 3,91 | 17,34 | 40 | 79,4±5,8 |
| 6 | 4,49 | 18,02 | 50 | 74,2±2,9 |
| 7 | 2,89 | 15,36 | 36 | 76,6±6,1 |
| 8 | 3,32 | 15,89 | 42 | 71,5±2,5 |
| 9 | 3,98 | 16,17 | 54 | 70,8±2,2 |
| 10 | 2,58 | 13,26 | 12 | 81,0±3,0 |
| 11 | 3,16 | 13,73 | 23 | 78,4±2,5 |
| 12 | 3,72 | 14,25 | 32 | 80,1±3,6 |
| 13 \*\* | 2,85 | 10,22 | 36 | 83,5±3,1 |
| ГОСТ 4661–67 | Не более 2,0 | 10–20 | - | - |

Анализируя табл. 13 и рис. видно, что все ванны, в состав которых входил ферментный препарат, обладали обезжиривающим действием. До обезжиривания содержание жировых веществ в волосяном покрове составило 15,22%. После обезжиривания содержание остаточного жира в волосе находилось в пределах от 2,58% (для ванны, содержащей Wetter HAC без разбавления) до 5,65% (для ванны с Превоцелл W-OF-7 при рН<7 и разбавлении 1:3). По ГОСТу 4661–76 содержание жировых веществ в волосяном покрове должно составлять 1,5–2%. В связи с этим необходимо дополнительное обезжиривание для эффективного удаления жира.

В кожевой ткани содержание остаточного жира до обезжиривания составило 22,64%. После обезжиривания минимальное количество жира было характерно для состава с Wetter HAC при рН<7 и без разбавления (13,26%), а максимальное – для среды с Превоцелл W-OF-7 при рН<7 и разбавлении 1:2 (17,88%), по типовой методике – 10,22%. Все показатели содержания жировых веществ соответствует ГОСТ 4661–76 (10–20%). Со снижением концентрации ферментного препарата в обезжиривающей ванне, то есть при разбавлении в 2 и 3 раза, наблюдалось ухудшение обезжиривающей способности.

До обезжиривания прочность связи волоса с кожевой тканью составила 19 Н. После обезжиривания при снижении концентрации ферментного препарата и поверхностно-активного вещества, в обезжиривающих ваннах наблюдалось увеличение прочности связи. Так минимальное значение величины прочности было характерно для ванны с Wetter HAC при рН<7 и без разбавления и составило 12 Н, а максимальное значение – для ванны с Превоцелл W-OF-7 при рН>7 и разбавлении 1:3 (54 Н). Контрольной являлась величина, измеренная после процесса обезжиривания I по типовой методике, которая составила 36 Н. Увеличение прочности связи волоса и кожевой ткани в процессе обезжиривания, вероятно, объясняется развитием и метаболизмом микроорганизмов.

Для меховой овчины после обезжиривания была характерна достаточно высокая степень белизны волосяного покрова. Максимальная белизна составила для волоса по типовой методике (83,5±3,1%). Это объясняется высоким содержанием концентрации СПАВ – 8 г/л в обезжиривающей ванне. При обезжиривании в составе, содержащем ферментный и Wetter HAC без разбавления, значение белизны составило 81,0±3,021%. Минимальная степень белизны характерна для составов с Превоцелл W-OF-7 при рН<7 и разбавлении 1:2 (70,9±4,9%) и разбавлении 1:2 (70,9±2,2%).

Таким образом, было установлено, что применение ферментного препарата с концентрацией 2–3 г./см3 при расходе СПАВ 0,4–0,5 г/дм3 обеспечивало оптимальное удаление жировых веществ с поверхности кожевой ткани. Но применение данного метода не обеспечивало достаточного удаления жировых веществ с волосяного покрова за один прием, поэтому для полного обезжиривания необходимо дополнительное проведение данного процесса.

После процесса обезжиривания определяли некоторые показатели сточных вод (табл. 14). рН обезжиривающих сточных вод находился в пределах 4,8–7,8, что соответствует ПДК для рыбохозяйственных водоемов (не более 4,5–8,5). Снижение величины рН наблюдалось с уменьшением концентрации ферментного препарата в рабочес растворе. После обезжиривания по типовой методике наблюдалась резко щелочная реакция (рН=9,5–10,0). В процессе обезжиривания увеличивается количество микроорганизмов, то есть lg КОЕ, но с разбавлением оно уменьшается. Так, для Превоцелл W-OF-7 при рН<7 без разбавления lg КОЕ =4,85; с разбавлением 1:2 lg КОЕ=3,64, а при разбавлении 1:3 lg КОЕ=3,02. В связи с этим увеличивается мутность. Максимальное значение мутности наблюдалось для ванны с Wetter HAC (рН<7) и составила D=6,0.

Также в процессе обезжиривания наблюдается уменьшение концентрации СПАВ. Максимальная остаточная концентрация СПАВ – 4,63 г./дм3 была характерна для процесса обезжиривания по типовой методике, что превышает нормы ПДК (0,1 г/дм3)в 46 раз. Это объясняется высокой начальной концентрацией – 8 г/дм3. Остаточная концентрация СПАВ после обезжиривания с Превоцелл W-OF-7 (рН<7) во всех 3-х ваннах немного превышает нормы ПДК и составила 0,15; 0,123; 0,105 г./дм3. Остальные составы соответствуют нормам ПДК.

Для оценки уровня токсического загрязнения (УТЗ) было проведено исследование токсичности вод после ферментативного обезжиривания I и обезжиривания по типовой методике. В качестве тест-объекта использовали рачков Daphnia magna Straus. Результаты оценки приведены в табл. 15.

Как видно из табл. 15, все сточные воды, включая стоки по типовой методике относились к 3 и 4 классу опасности, т.е. β-М-Т (токсичные) и α-М-Т (малотоксичные). Исключением являлись сточные воды, содержащие в своем составе Превоцелл W-OF-7 при рН=7 и разбавлении 1:3, при объеме вод 0,1 см3, которая относилась к олиготоксичным, т.е. условно нетоксичным (100% выживаемость организмов).

Таким образом, качество меховых овчин после обезжиривания с ферментными препаратами и минимальной концентрацией СПАВ максимально приближается к качеству овчин, обезжиренных по типовой методике. В результате оценки некоторых показателей сточных вод после процесса обезжиривания I видно, что технология, основанная на применении ферментного препарата, продуцируемого культурой рода Listeria sp при минимальном расходе СПАВ позволяет несколько улучшить параметры сточных вод. Из проведенных исследований УТЗ следует, что токсичность сточных вод при проведении обезжиривания с ферментным препаратом и по типовой методике одинакова, за исключением состава Превоцелл W-OF-7 при рН=7 и разбавлении 1:3, токсичноcть которого составила О-Т (олиготоксичные).

Таблица 15. Оценка УТЗ на дафниях

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Тип ван-ны | | Объем сточ-ной воды, см3 | | Выживаемость Daphnia magna, % | | | | | | | | | | | | | | | УТЗ | | |
|  | |  | | 1 ч | | 2 ч | | 3 ч | | 24 ч | 48 ч | | 72 ч | | | | 96 ч | |  | | |
| 1 | | 1,0  0,5  0,1 | | 100  100  100 | | 100  100  100 | | 100  100  100 | | 100  100  100 | 60  80  80 | | 40  60  80 | | | | 40  60  80 | | β-М-Т  β-М-Т  β-М-Т | | |
| 2 | | 1,0  0,5  0,1 | | 100  100  100 | | 100  100  100 | | 100  100  100 | | 100  100  100 | | 60  80  100 | 20  60  80 | | | 20  60  80 | | | α-М-Т  β-М-Т  β-М-Т | | |
| 3 | 1,0  0,5  0,1 | | 100  100  100 | | 100  100  100 | | 100  100  100 | | 100  100  100 | | | 40  60  80 | | 20  40  60 | 0  20  60 | | | α-М-Т  α-М-Т  β-М-Т | | |
| 4 | 1,0  0,5  0,1 | | 100  100  100 | | 100  100  100 | | 100  100  100 | | 100  100  100 | | | 60  60  60 | | 40  60  60 | 20  40  40 | | | α-М-Т  β-М-Т  β-М-Т | | |
| 5 | 1,0  0,5  0,1 | | 100  100  100 | | 100  100  100 | | 100  100  100 | | 100  100  100 | | | 60  100  100 | | 40  80  60 | 0  80  60 | | | α-М-Т  β-М-Т  β-М-Т | | |
| 6 | 1,0  0,5  0,1 | | 100  100  100 | | 100  100  100 | | 100  100  100 | | 100  100  100 | | | 40  60  100 | | 20  40  100 | 0  20  100 | | | α-М-Т  α-М-Т  О-Т | | |
| 7 | 1,0  0,5  0,1 | | 100  100  100 | | 100  100  100 | | 60  60  80 | | 20  20  40 | | | 0  0  20 | | 0  0  0 | 0  0  0 | | | α-М-Т  α-М-Т  α-М-Т | | |
| 8 | 1,0  0,5  0,1 | | 100  100  100 | | 100  100  100 | | 80  80  100 | | 60  60  80 | | | 20  40  80 | | 0  40  80 | 0  20  60 | | | α-М-Т  α-М-Т  β-М-Т | | |
| 9 | 1,0  0,5  0,1 | | 100  100  100 | | 100  100  100 | | 60  60  100 | | 40  40  60 | | | 20  20  60 | | 0  0  0 | 0  0  0 | | | α-М-Т  α-М-Т  α-М-Т | | |
| 10 | 1,0  0,5  0,1 | | 80  100  100 | | 80  100  100 | | 80  100  100 | | 60  60  80 | | | 0  20  20 | | 0  0  20 | 0  0  0 | | | α-М-Т  α-М-Т  α-М-Т | | |
| 11 | 1,0  0,5  0,1 | | 60  100  100 | | 60  100  100 | | 60  100  100 | | 40  60  60 | | | 0  20  20 | | 0  0  0 | 0  0  0 | | | α-М-Т  α-М-Т  α-М-Т | | |
| 12 | 1,0  0,5  0,1 | | 100  100  100 | | 100  100  100 | | 100  100  100 | | 40  60  100 | | | 0  20  60 | | 0  20  40 | 0  20  40 | | | α-М-Т  α-М-Т  β-М-Т | | |
| 13 | | 1,0  0,5  0,1 | | 100  100  100 | | 80  100  100 | | 80  100  100 | | 80  100  100 | | 40  100  100 | 0  20  60 | | | 0  0  40 | | | | α-М-Т  α-М-Т  β-М-Т | |

**4. Экономическая часть**

Одной из экологических проблем мехового производства является снижение загрязнения сточных вод синтетическими поверхностно-активными веществами (СПАВ), которые применяются при выполнении обезжиривания. Наиболее перспективным является совершенствование технологических процессов на основе биотехнологических методов, позволяющих уменьшить расход химических материалов, используемых в производстве, что ведет к снижению уровня техногенного воздействия на окружающую среду.

Одним из способов, позволяющих сохранить качество обезжиривания мехового полуфабриката при снижении степени загрязнения сточных вод, является проведение совмещенного эмульсионного и микробиологических методов обезжиривания. Применение предложенного метода обезжиривания меховой овчины позволит уменьшить расход СПАВ с 8 до 0,5 г/дм3, исключить введение в обезжиривающую ванну карбоната натрия и формальдегида. Все это позволит сократить расходы на выполнение технологического процесса, а также уменьшить плату за сброс сточных вод в городские канализационные сети.

**4.1 Расчет расхода химических материалов**

Расчет расхода химических материалов для проведения процесса обезжиривания I ведется на 1000 дм2 готовой меховой овчины с массой партии 46 кг и определяется по формуле (14):

С×V

R= –, (14)

1000

где R – расход химматериалов, кг;

С – концентрация вещества, г/дм3;

V – общий объем раствора, дм3;

1000 – перевод в кг.

Расход химических материалов по типовой и разработанной методикам представлен в табл. 16.

Таблица 16. Расход химических материалов для процесса обезжиривания первого

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Наименование  процесса | Наименование  химматериалов | Концентрация веществ | |
|  |  | по типовой методике | по разработанной методике |
| Обезжиривание  первое | Стиральный порошок «Баргузин»  Карбонат натрия  Формалин 40%-ный  СПАВ  Ферментный препарат | 8,0 г/дм3  0,5 г/дм3  0,5 см3/дм3  -  - | -  -  -  0,5 г/дм3  0,25 г./дм3 |

Стоимость материалов представлена в табл. 17.

Годовой расход химматериалов для фабрики по производству меховой овчины мощностью 30 млн. дм2 в год представлен в табл. 18.

**4.2 Расчет платы за сброс сточных вод в городские канализационные сети**

При расчете платы за сброс сточных вод после процесса обезжиривания I в канализационные сети использовали постановление Правительства Республики Бурятия №76 от 18.03.97. Объем сточных вод после обезжиривания составил 4,3 м3.

Состав сточных вод представлен в табл. 19.

Плата за нормативный и сверхнормативный сброс представлены в табл. 20–21.

Годовой объем платы за сброс загрязняющих веществ в городские канализационные сети представлен в табл. 22.

Годовые затраты на переработку меховой овчины и плата за сброс сточных вод в городские канализационные сети по типовой и разработанной методикам представлены в табл. 23.

Таким образом, в результате проведенных расчетов годовой экономический эффект для фабрики по производству меховой овчины мощностью 30 млн. дм2 при применении Превоцелл W-OF-7 – 2019,117 т. руб., Wetter HAC – 424, 36 т. руб.

Таблица 17. Стоимость химматериалов на калькуляционную единицу

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Наименование | Наименование  химматериалов | Единица из- | Расход химматериалов | | Цена, руб. | Стоимость, руб. | | |
| процес-са |  | мере-  ний | по типовой методике | по разработ. методи- |  | по типовой методике | по разработанной методике c применением | |
|  |  |  |  | ке |  |  | Превоцелл  W-OF-7 | Wetter HAC |
| Обезжиривание первое | Порошок «Баргузин»  Карбонат натрия  Формалин 40%-ный  Превоцелл W-OF-7  Wetter HAC  Ферментатив-ный препарат | Кг  Кг  Дм3  Кг  Кг  Кг | 2,7816  0,2318  0,2318  -  -  - | -  -  -  0,2318  0,2318  0,1159 | 20,00  22,70  6,48  100,00  220,50  120,00 | 55,6320  5,2619  1,5021  -  -  - | -  -  -  23,180  -  13,908 | -  -  -  -  50,110  13,908 |
| Итого | - | - | - | - | - | 62,3960 | 37,088 | 64,018 |

Таблица 18. Годовой расход химматериалов (мощность 30 млн. дм2 вгод)

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Наиме-нование | Наименование химматериалов | Единица из- | Расход химматериалов | | | Цена, руб. | Стоимость, руб. | | |
| процес-  са |  | мере-  ний | по типовой методике | по разработ. методике с примене – нием | |  | по типовой методике | по разработанной методике c применением | |
|  |  |  |  | Прево-целл  W-OF-7 | Wetter  HAC |  |  | Прево-целл  W-OF-7 | Wetter HAC |
| Обезжи-ривание первое | Порошок «Баргузин»  Карбонат натрия  Формалин 40%-ный  Превоцелл W-OF-7  Wetter HAC  Ферментатив-ный препарат | Кг  Кг  Дм3  Кг  Кг  Кг | 82448  6954  6954  -  -  - | -  -  -  6954  -  3477 | -  -  -  -  6954  3477 | 20,00  22,70  6,48  100,00  220,50  120,00 | 1668960,00  157855,80  45061,92  -  -  - | -  -  -  695400  -  417240 | -  -  -  -  1533357  417240 |
| Итого | - | - | - | - | | - | 1871877,72 | 1112640 | 1950597 |

**5. Безопасность жизнедеятельности**

**5.1 Правила работы и поведения в лаборатории**

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

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 загораний 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.

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 (доврачебной) 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).

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 загрязнений 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 линолиумом. При выборе материала облицовки рекомендуется отдавать предпочтение тем, которые имеют гладкую поверхность, плохо сорбируют вредные вещества, не корродируют, 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 хранение 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 связана 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.

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 /54/.

**5.2 Требования к микробиологическим лабораториям**

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 вызывать 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.

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 покрывные 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, конъюктиву или в рот принимают экстренные меры к обеззараживанию.

Перед уходом из лаборатории снимают халаты, руки обрабатывают дезинфицирующим раствором и тщательно их моют /55/.

5.3 Правилах хранения химических веществ

Хранение химических веществ является важным этапом обеспечения безопасности работы. Химические лаборатории меховых предприятий, как правило, потребляют небольшое количество токсичных взрыво- и пожароопасных веществ, поэтому там не требуется организация многочисленных дифференцированных хранилищ веществ каждой группы (всего их восемь). Однако это не должно приводить к тому, чтобы взрыво-, пожароопасные и токсичные вещества хранились где и как угодно. Администрация должна обеспечить сохранность документации, так как часто в процессе работы возникает необходимость выяснить характеристику поступивших в лабораторию химических веществ. Следует помнить, что химические вещества могут храниться в лаборатории только в объёме дневной потребности.

При планировке помещения склада необходимо учитывать специфику хранения ряда химических веществ. Легковоспламеняющиеся, взрывчатые вещества (металлический натрий, кальций и др.), а также сильные окислители (пероксиды водорода, натрия, концентрированные кислоты и др.) необходимо хранить в ограниченных количествах в защитных от влаги, пыли и света местах. Химические вещества нельзя хранить в таре без надписи. Необходимо постоянно следить за тем, чтоб надписи были легкочитаемыми, периодически их восстанавливая. Химическое вещество в таре без надписи подлежит уничтожению или анализу (с большой осторожностью!).

На химических складах должны быть технические весы (для взвешивания веществ с точностью до 0,1г) и аналитические (для взвешивания токсичных веществ с точностью до 0,001г). Необходимо также иметь комплект расфасовочного инвентаря (шпатели, ложечки, лопаточки, совки, цилиндры и пр.). В целях сохранения частоты химических реактивов и безопасности работы целесообразно закрепить за определённым веществом свой комплект. После расфасовки использованный инвентарь следует сразу же помыть или почистить.

Тару для хранения кислот во избежание разрыва при тепловом расширении надо заполнять не более, чем на 0,9 объёма. Стеклянные бутыли должны храниться в корзине и иметь плотную обрешётку. Очень опасно совместное хранение азотной, серной, хлорной кислот с органическими веществами. Расфасовка кислот должна производиться с помощью специальных сифонов и насосов. Концентрированные кислоты должны поступать в лабораторию в таре вместимостью 1–2 л. Для нейтрализаций пролитых кислот в лаборатории имеется в достаточном количестве щелочные растворы.

Строго воспрещается переносить на спине и перед собой бутылки с кислотами. Для их транспортировки необходимы специальные тележки.

Хранилища химических веществ должны быть оборудованы автоматическими системами контроля и индикации концентрации вредных веществ в воздушной среде, а также защитными средствами (противогазами, респираторами, защитными очками, спецодеждой) и средствами пожаротушения /56/.

**6. Охрана окружающей среды. спав и их вовлечение в метаболические процессы**

Поверхностно-активные вещества (ПАВ) представляют собой разнородную по химической структуре группу соединений, которые обладают одинаковой способностью снижать поверхностное натяжение. ПАВ принято делить на ионогенные, диссоциирующие на ионы в водной среде, и недиссоциирующие – неионогенные. К ионогенным относятся анионактивные (АПАВ), которые при диссоциации образуют макроанион, обладающий поверхностной активностью, катионные (КПАВ), образующие поверхностно-активный макрокатион, и амфотерные или амфолитные, диссоциирующие как АПАВ или как КПАВ в зависимости от реакции среды. Большую угрозу загрязнения воды представляют анионные и неионогенные поверхностно-активные вещества, широко используемые в качестве компонентов моющих средств или детергентов. Наряду с моющим действием ПАВ характеризуются эмульгирующими, диспергирующими, солюбилизирующими и другими полезными свойствами, в связи с чем находят самое разнообразное применение в промышленности, сельском хозяйстве, строительстве, быту, медицине и т.д./3/.

Целевое назначение ПАВ как моющих средств обуславливает попадание почти всего объема их продукции в сточную воду, которая, в свою очередь, может загрязнять поверхностные водоемы, грунтовые воды, почву. Химические и физико-химические методы очистки стоков не решают проблемы борьбы с загрязнением воды поверхностно-активными веществами, так как при использовании этих методов ПАВ, как правило только концентрируются или разрушаются частично, но не разлагаются полностью до СО2, Н2О и других простейших продуктов. Полная деструкция детергентов осуществляется микроорганизмами, на использовании которых основаны все биологические методы очистки воды. Однако очистка стоков от ПАВ общепринятыми биологическими методами затруднена, поскольку многие из этих веществ сравнительно устойчивы к микробному разложению и проходят через очистные сооружения, не изменяясь. При этом ПАВ из-за высокой способности к пенообразованию нарушают их работу, снижая скорость оседания активного ила. Разнесение ветром пены создает эпидемиологическую опасность, так как вместе с пеной распространяются болезнетворные бактерии, в частности возбудители кишечных инфекций. Число бактерий в водоемах при пенообразовании очень возрастает из-за того, что в пене создаются чрезвычайно благоприятные трофические условия. Незначительное количество (0,2–0,4 мг/л ПАВ) придает неприятный вкус и запах питьевой воде. Образование пены на поверхности водоемов нарушает кислородный режим и вызывает массовую гибель населяющей их флоры и фауны /57/.

Таким образом, совершенно очевидна необходимость интенсификации и поиска новых эффективных биологических методов очистки сточных вод от ПАВ. Наряду с этим направлением важное значение важное значение имеет изучение биоразлагаемости рекомендуемых для практики синтетических ПАВ, целью которого является выбор наиболее легко биологически окисляемых веществ. Способность ПАВ биодеградировать зависит от их химической структуры. Строение молекулы вещества, с одной стороны предопределяет его пригодность в качестве субстрата соответствующих ферментов, а с другой – сказывается на антимикробных свойствах соединения. Известно, что анионактивные ПАВ обладают микробоцидным и микробостатическим действием. При этом показано, что вещества, характеризующиеся высокой антимикробной активностью, одновременно наиболее стойки к микробному разложению. В связи с этим вполне вероятно, что первым этапом взаимодействия микроорганизмов с ПАВ является приобретение им резистентности к данному веществу. Именно среди резистентных особей в дальнейшем селекционируются клетки, способные разрушать ПАВ, используя их в качестве источника питания /58/.

Биодеградацию ПАВ определяют как в природной, так и в сточной воде. Наблюдаемая при этом вариабельность результатов обусловлена следующими факторами: 1) разными происхождение образцов воды и ила, а также временем адаптации ила к изучаемому веществу; 2) температурой, при которой проводится опыт; 3) концентрацией испытуемого соединения; 4) временем инкубации; 5) природой дополнительного органического материала в образце воды; 6) различным составом технических препаратов исследуемых ПАВ. Биодеградация должна пройти настолько глубоко, чтобы образовались продукты, приемлемые для окружающей среды. Изучают как первичную, так и полную деградацию ПАВ. Под первичной подразумевают потерю веществом поверхностной активности, которую определяют, измеряя специфическими методами поверхностное натяжение или устанавливая концентрацию веществ, способных соединяться с метиленовой синью – для АПАВ, и веществ, способных соединяться с висмутом – для НПАВ. О частичном разложении ПАВ до безвредных продуктов судят по поведению живых организмов (дафний, рыб) в исследуемой очищенной воде. Полное разложение поверхностно-активных соединений до неорганических веществ оценивают неспецифическими методами, определяя БПК, ХПК, общий органический углерод, выделение СО2. Некоторые авторы предлагают судить о разрушении ПАВ по интенсивности роста бактерий-деструкторов на средах с этими веществами /59/.

В зависимости от способности к биодеградации моющие средства моющие средства, по предложению Богена и Сойер /60/, делят на «мягкие» и «жесткие». «Мягкие» детергенты сравнительно легко разрушаются микроорганизмами. К этой группе относятся вещества, которые на 85% удаляются активным илом в аэротенке, разлагаясь при этом до СО2 и Н2О. «Жесткие» удаляются лишь на 40–45%. Остальные вещества составляют промежуточную группу.

В практике в настоящее время наиболее широко применяются анионные ПАВ, а именно: алкилсульфаты общей формулы R-OSO3Na, алкилсульфонаты-R-SO3Na, и алкилбензолсульфонаты, где R – неразветвленная (линейная) или разветвленная углеводородная цепь, чаще всего из 10–18 углеродных атомов. Первые исследования разлагаемости анионных ПАВ микроорганизмами проводились с активным илом и речной водой. В этих опытах показано, что скорость биодеградации АПАВ зависит прежде всего от строения алкильной цепи. Вещества с неразветвленной (линейной) цепью сравнительно легко разрушаются микроорганизмами активного ила. Разветвления в цепи задерживают разложение ПАВ. Медленно разлагаются, например тетрапропиленбензолсульфонат, в прошлом широко используемый в промышленности и в быту. Биодеградация осуществляется легче при большей длине алкильной цепи, а сульфонатов – при большем расстоянии между концом цепи и гидрофильной группой. Однако с увеличением длины алкильной цепи свыше С14-С18 активность деструкции падает, что объясняется снижением растворимости. Для алкилбензолсульфонатов (АБС) установлено, что одиночная боковая метильная группа на ближнем или отдаленном конце цепи только незначительно замедляет процесс биодеградации. Наличие терминальной четвертичной группы не имеет большого значения, если есть открытый конец цепи. Если же такого открытого конца нет, то наблюдается заметное торможение процесса. Деградация происходит, но не обычным метаболическим путем, и облегчается при увеличении длины цепи.

Большой интерес представляют исследования разложения ПАВ чистыми культурами микроорганизмов. Так, Ризен /61/ показал, что Ps. aeruginosa, Serratia marcenses, Escherichia coli, Aerobacter aerogenses при выращивании на синтетической среде могут использовать различные анионные ПАВ в качестве единственного источника углерода. Обнаружено, что на скорость биоразложения влияет минеральный состав питательной среды. Из почвы, сточных вод и активного ила были выделены бактерии, способные расти на среде с АБС в качестве единственного источника углерода: Alcaligenes faecalis (7 культур), A. viscosus (2), A. bookeri (1), Pseudomonas sp. (11), Flavobacterium suaveolans (1), Escherichia coli (1). 15 штаммов из 34 прекрасно росли на АБС. Для 7 культур не была токсичной даже такая высокая концентрация вещества, как 1000 мг/л.

Также были выполнены интересные работы. Из почвы, взятой в районе очистного сооружения, методом накопления были выделены два штамма Pseudomonas – С12 и С12В. Первый штамм разрушал только додецилсульфат (ДДС), второй еще и додецилбензолсульфонат. Необходимо отметить, что представители рода Pseudomonas особенно часто выделяются из культур накопления на средах с анионными ПАВ. Так, на селективной среде с АБС из активного ила были изолированы 16 штаммов. Все выделенные культуры разрушают линейны алкилбензолсульфонат.

Были выделены из сточной воды и изучены активность деструкции лаурилсульфоната и тетрапропилбензолсульфоната у 40 штаммов бактерий, отнесенных к разным родам. Большинство культур довольно быстро разрушало лаурилсульфонат. Тетрапропилбензолсульфонат оказался более стойким к биодеградации. Разложение этого соединения вызывали Bact. imperiale и смесь Corynebacterium annamensis и Flavobact. diffusum. Как свидетельствуют опыты, в метаболизме АБС принимают участие и представители рода Bacillus. Bacillus sp., изолированный из хозяйственно-бытовых стоков на солевой среде с 0,05% ундецилбензол-n-сульфоната, рос на всех гомологах этого соединения с длиной алкильного радикала от С1 до С18, на бензолсульфонате, n-оксибензоате, 3,4 – диоксибензоате. Из различных субстратов (речная и морская вода, бытовые стоки, сточные воды предприятий по производству анионных ПАВ, активные илы городских и заводских очистных установок, почва, песок, ризосфера растений, настой сена) на синтетических средах, содержащих алкилсульфаты (АС) в качестве единственного источника углерода и энергии, изолированы бактерии, активно разлагающие эти соединения.

Для выделения микроорганизмов были использованы метод накопительных культур и разработанный метод обнаружения микробов-деструкторов /62/. Этот метод заключается в посеве исследуемого материала на агаризованную синтетическую среду определенного солевого состава, содержащую 0,7–1,0 г/л ДДС. В такой среде додецилсульфат образует в толще агара кристаллы. Метод основан на способности микробов, разрушающих АС, образовывать вокруг колоний прозрачные зоны в результате использования вещества клетками. Величина зон тем больше, чем выше деструктивная активность штамма. С помощью указанных методов было выделено свыше 100 бактериальных культур, способных метаболизировать ДДС в солевой среде. Детально изучены 42 штамма. Бактерии идентифицированы по определителю Берги на основании 36 признаков. Преобладающее большинство выделенных культур (33 штамма) отнесены к роду Pseudomonas. Среди флюоресцирующих псевдомонад, выделенных из почв, ризосферы и сточных вод, идентифицированы различные биотипы Ps. forescens, Ps. putida, Ps. arantiaca, Ps. aeruginosa. Все выделенные штаммы активно разлагают ДДС, а часть из них – и технические препараты АС, содержащие смесь гомологов с различной длиной углеводородной цепи (табл.). Технические препараты алкилсульфонатов и алкилбензолсульфонатов данными бактериями не разрушались. Попытки изолировать споровые дрожжи оказались безуспешными.

Исследовали способность разрушать алкилсульфаты также у зеленых водорослей рода Chlorella. О роли водорослей в биоразложении ПАВ данных в литературе мало. В то же время вопрос взаимодействия водорослей и ПАВ чрезвычайно важен, поскольку водоросли в большом количестве развиваются в биофильтрах и окислительных прудах, которые используются для биологической очистки сточных вод. Кроме того, значительный интерес представляет изучение водорослей в процессах самоочищения водоемов от ПАВ. В работе Девиса и Глойне /63/ сделана попытка изучить деструктивную способность водорослей и показано, что все взятые в опыт водорослевые культуры слабо разлагают некоторые анионактивные и неионогенные ПАВ. Однако отсутствие контроля бактериального загрязнения ставит под сомнение полученные авторами результаты.

В опытах /64/ исследовались три бактериально чистые культуры зеленых водорослей рода Chlorella: Chl. Vulgaris, штаммы 62 и М, и Chl. pyrenoidosa. Chl. vulgaris M выделена из сточных вод Магнитогорского металлургического комбината, две другие культуры получены в отделе регуляторных механизмов клетки Института молекулярной биологии и генетики АН УССР. Культуры Chl. vulgaris 62 и Chl. vulgaris M выращивали в люминостате при температуре 22–240 и освещенности 3000 лк на модифицированной жидкой и агаризованной среде Тамия. Адаптированный к гетеротрофному способу питания штамм Chl. pyrenoidosa выращивали в темноте в термостате при температуре 26–280 на жидкой и агаризованной среде ФДГА. При изучении влияния ДДС на водоросли к агаризованным средам Тамия и ФДГА добавляли от 1 до 200 мг/л соединения. Через 5–6 суток отмечали наличие или отсутствие роста водорослевых культур. Способность водорослей разрушать ДДС изучали на аналогичных жидких средах с ПАВ. О влиянии ДДС на водоросли в жидких средах судили по приросту биомассы, подсчитывая общее число клеток хлореллы в камере Горяева, и по соотношению живых и мертвых клеток. С целью выявления возможного бактериального загрязнения водорослей культуральную жидкость при каждом отборе проб высевали на МПА и агаризованные среды Тамия и ФДГА с ДДС. При выращивании водорослевых культур на агаризованных средах 1–50 мг/л вещества не оказывают неблагоприятного влияния на их рост. В присутствии 100 мг/л ПАВ отмечено угнетение роста, особенно у автотрофных штаммов. При выращивании на соответствующей жидкой среде с 50 мг/л ДДС автотрофные штаммы Chl. vulgaris 62 и Chl. vulgaris M дают значительно меньший прирост биомассы и более высокий процент мертвых клеток по сравнению с контролем без ПАВ. Концентрация ДДС в культуральной среде этих водорослей не изменяется. В отличие от двух других штаммов Chl. pyrenoidosa дает практически одинаковый прирост биомассы в контроле и опытном варианте, где вместо глюкозы в среду вносили 50 мг/л ПАВ. При этом в среде с ДДС существенно повышается число мертвых клеток. В то же время добавление к полноценной среде ФДГА додецилсульфата натрия в концентрациях 50 и 100 мг/л несколько стимулирует рост культуры Chl. pyrenoidosa. Количество мертвых клеток также превышает их число в контроле, однако их меньше, чем на среде с ПАВ без глюкозы. Во всех опытных вариантах отмечено снижение концентрации ДДС. Убыль большей части ДДС в культуральной жидкости Chl. pyrenoidosa происходит за 8 суток. После этого в среде еще определяются остаточные количества вещества, которое не разрушается при дальнейшем культивировании водорослей. Полное исчезновение ПАВ наблюдается лишь в одном случае – при наличии в среде 50 мг/л вещества и глюкозы. Контроль загрязнения показал, что на протяжении всех опытов культуры водорослей были бактериально чистыми. Таким образом, полученные данные позволяют сделать вывод о том, что некоторые штаммы водорослей Chlorella способны разрушать алкилсульфаты. Активность водорослей значительно ниже активности бактерий. Однако деструкция алкилсульфатов водорослями, по-видимому, может играть определенную роль в водоемах, загрязненных ПАВ.

В последние годы много внимания уделяется изучению путей микробного метаболизма анионных ПАВ, а также выделению и исследованию ферментов, ответственных за их разрушение. Показано /65/, что углеводородные радикалы алкилсульфатов, алкилсульфонатов и алкилбензолсульфонатов окисляются в тех же биохимических реакциях, что и углеводороды, жирные кислоты и спирты. Пути микробной деструкции алкилбензолсульфонатов включают также реакции расщепления бензольного кольца.

АБС более устойчивы к разложению и, поскольку они количественно преобладают в общем объеме продукции ПАВ, их метаболизм изучен детальнее. Основными биохимическими реакциями, ведущими к разрыву связей С-С, в результате чего разрушается молекула АБС, являются ω-окисление, т.е. окисление терминальной метильной группы в алкильной цепи, α-окисление, β-окисление и деструкция бензольного кольца при помощи механизмов орто- или мета-расщепления. ω-Окисление алкильного радикала происходит аналогично разложению прямоцепочечных углеводородов через образование спирта и альдегида до карбоксикислоты:

– СН2-СН3 → – СН2-СН2ОН → – СН2-СНО → – СН2-СООН.

При α-окислении алкильная цепь прогрессивно укорачивается на один атом углерода, который выделяется в виде СО2. β-Окисление ведет к последовательному уменьшению алкильной цепи на два атома углерода сразу.

Хейман и Молоф исследовали способность выделенной Пейном с сотрудниками /66/ культуры Pseudomonas С 12В метабилизировать линейные первичные и вторичные алкилбензолсульфонаты с различной длиной улеводородной цепи. Культура разрушала АБС с короткими 1- и 2-углеродными алкильными цепями. АБС с длинной (С3-С12) цепью начинали разлагаться только после предварительной инкубации бактерий со спиртами, альдегидами или кислотами, как с соответствующим числом атомов углерода, так и с более длинной цепью. Авторы предполагают, что для разложения АБС с длинной алкильной цепью необходима предварительная индукция соответствующих ферментов соединениями, близкими по структуре к изучаемым АБС, но не содержащими кольца. Бактериальная деструкция АБС происходит в результате ряда биохимических реакций: ω-окисления, β-окисления, вторичного ω-окисления, α-окисления, неполного β-окисления и декарбоксилирования, которые приводят к образованию бензойной или фенилуксусной кислоты. Причем АБС с нечетным числом углеродных атомов в алкильной цепи метаболизируется через бензойную, а с четным – через фенилуксусную кислоту. Вещества с четным числом атомов углерода индуцируют путь бензойной кислоты, с нечетным – оба пути. Дальнейшее разрушение бензойной и фенилуксусной кислот происходит с разрывом кольца.

Неионогенные ПАВ еще более разнообразны по своей химической структуре, чем анионные. Они представляют собой продукты присоединения окиси этилена к веществам, содержащим активный водород, например, к алкилфенолам, жирным спиртам, меркаптанам и др. Практически любое соединение, молекула которого наряду с гидрофобным радикалом содержит карбоксильную, гидроксильную, амидную или аминную группу с подвижным атомом водорода, может реагировать с окисью этилена, образуя неионогенное ПАВ. Гидрофильную группу в молекуле НПАВ могут образовывать, помимо окиси этилена, и другие соединения. Так, довольно широко применяются НПАВ – сложные эфиры маннита и сорбита, которые называют соответственно маннитаны и сорбитаны или спаны. Оксиэтилированные эфиры сорбита и маннита нашли распространение под названием «твины». Хорошо известны НПАВ, в состав которых, наряду с окисью этилена, входят остатки окиси пропилена – так называемые блок-сополимеры. Разнообразие химического строения НПАВ создает трудности при анализе этих веществ и приводит к получению весьма противоречивых результатов при изучении биоразлагаемости /67/.

Сведения о биодеградации НПАВ получены в основном в опытах с комплексными биоценозами – водными микроорганизмами, активным илом, биопленками. Так, Каплин и соавторы /68/ изучали скорость распада в природной воде оксиэтилированных синтетических жирных спиртов, алкилфенолов, блок-сополимера окисей этилена и пропилена в концентрациях 1–10 мг/л. Оксиэтилированные жирные спирты в водоемах распадаются быстро, медленнее распадается блок-сополимер и еще медленнее – оксиэтилированные алкилфенолы. Скорость распада изучаемых веществ зависит от их исходной концентрации и количества оксиэтильных групп. Оксиэтилированный алкилфенол с десятью оксиэтильными группами в концентрации 1 мг/л разрушается полностью на 49-е сутки, а при концентрации 10 мг/л на 174-е сутки остается еще 37% неразрушенного вещества. Оксиэтилированный алкилфенол (семь оксиэтильных групп) в концентрации 1 мг/л деградирует на 139-е сутки, к тому же времени распад 10 мг/л происходит на 72%.

В работах Трифоновой Т.В. с сотрудниками /69/ приводятся данные о биоразложении продуктов присоединения смеси окиси этилена и окиси пропилена к первичным жирным спиртам. Исследователи изучали продукт оксиалкилирования синтетических первичных спиртов фракции С10-С13 (около 10% спиртов изостроения), содержащий в среднем 8 оксиалкиленовых групп, а также продукт оксиалкилирования н-додецилового спирта, содержащий в среднем 10 оксиалкиленовых групп. Разрушение с помощью активного ила происходит на 92–99%. Степень удаления НПАВ из сточных вод зависит от степени адаптации активного ила. Так, вещество почти полностью разлагается адаптированным активным илом за 6 ч, в то время как неадаптированный активный ил за это же время удаляет из стока лишь 43% НПАВ.

Таким образом, можно заключить, что скорость окисления НПАВ зависит от их химического строения, т.е. от длины и степени разветвленности алкильной цепи и от длины полиэтиленгликолевой цепи. Наиболее полно и быстро разрушаются соединения, полученные на основе нормальных первичных и вторичных спиртов, алкильная цепь которых содержит более 7 атомов углерода, а полиоксиэтиленовая – не более 10–12 молей окиси этилена. Недостаточно полно окисляются прямоцепочечные алкилфенолы, так как на скорость деструкции влияет ароматическое кольцо. Наиболее устойчивыми к биоразрушению являются оксиэтилированные алкилфенолы, с количеством оксиэтильных групп более 10. Положение фенольного кольца в прямой алкильной цепи оказывает большое влияние на скорость деградации. Деструкция неионогенных поверхностно-активных веществ происходит в два этапа: 1) карбоксилирование конечной метильной группы с последующим β-окислением и 2) гидролиз полиэтиленгликолевой цепи. При этом образуются следующие типы молекул: 1) с неповрежденной гидрофобной и деградированной полиэтиленгликолевой цепями; 2) с карбоксилированной гидрофобной и ненарушенной полиоксиэтиленовой цепями; 3) с карбоксилированной гидрофобной и деградированной полиоксиэтиленовой цепями.

При разрушении гидрофильной цепи образуются этиленгликоли, которые в свою очередь разлагаются микроорганизмами до углекислоты и воды. Этиленгликоль может разлагаться уксусными бактериями Gluconobacter melanogenus, Acetobacter ascedens, A. аceti, A. рasteurianum, использующими его в качестве источника углерода. При окислении гликолей уксусными бактериями образуется гликолевый альдегид, а затем гликолевая кислота /70/.

Таким образом, накопившееся в последние годы данные о биоразлагаемости ПАВ свидетельствуют о необходимости, с одной стороны, синтеза и внедрения в производство легко биоразрушаемых соединений, а с другой – разработки новых интенсивных методов очистки вода от ПАВ. Эти методы должны основываться на использовании специально полученных высокоактивных чистых культур микроорганизмов, деструкторов ПАВ. Применение таких культур в микробном методе очистки будет способствовать защите водоемов от загрязнения синтетическими соединениями и сохранению окружающей человека природы.

**Заключение**

В работе проведен анализ литературных источников по теме: «Механизм воздействия прокариотических микроорганизмов на СПАВ и липазу». Показана способность микроорганизмов расщеплять синтетические поверхностно-активные вещества, которые, в свою очередь взаимодействуют с различными компонентами клеточных стенок бактерий, включая муреиновый слой, белки, липиды, липопротеины, липополисахариды. Изучена возможность микроорганизмов продуцировать внеклеточные ферменты (липазы).

В работе исследовались синтетические поверхностно-активные вещества и культуры микроорганизмов, возможность проведения с их помощью процесса обезжиривания меховой овчины.

Выделено 6 микробных культур из сточных вод после эмульсионного процесса обезжиривания. Изучены и описаны их морфологические особенности, физиологические и культуральные свойства. Проведена селективная адаптация выделенных микробных продуцентов на средах, содержащих оливковое масло, шерстный жир и СПАВ.

На основе результатов исследования липолитической и протеолитической активностей были отобраны культуры рода Listeria sp 3, Listeria sp 7, Listeria sp I.

Разработана принципиальная технологическая схема получения концентрированного ферментного препарата, основанная на применении культур 3, 7, I с использованием синтетической среды, включающей минеральные соли, шерстный жир и синтетические поверхностно-активные вещества. Данный метод культивирования позволяет получать микроорганизмы с заданными свойствами, способными деструктировать жировые вещества и СПАВ.

Разработана технология, основанная на совмещении микробиологического и эмульсионного обезжиривания меховой овчины, она исключает использование карбоната натрия и формальдегида, а также уменьшает расход СПАВ в 16 раз, что позволяет снизить уровень токсического загрязнения сточных вод.

**Список использованных источников**

1. Асонов Н.Р. Микробиология.-М.: Агропромиздат, 1982. – 351 с.

2. Шульговская Е.М., Иванова И.И. Состав клеток Pseudomonas при разных условиях культивирования // Микробиология, 1975, т. 44, №6. – С. 1022–1024.

3. Ребиндер П.А. Поверхностно-активные вещества. – М.: Знание, 1961. – 45 с.

4. Ксандопуло Г.Б., Рубан Е.Л. Биологическое действие ПАВ на микроорганизмы // Микробиологическая промышленность. – 1971, N6. – С. 60–66.

5. Елисеев С.А. и др. О механизме действия поверхностно-активных веществ на бактериальные клетки/ Елисеев С.А., Снежко И.А., Шульга А.Н./ МГУ. Биол. Фак. – М, 1984. – С. 4–7.

6. Турковская О.В. Микробиологическая деструкция НПАВ. Дис. Канд. биол. наук. – Саратов: Мед. институт, 1989. – 173 с.

7. Гельман Н.С. Изучение структуры биологических мембран при помощи фрагментации детергентами // Успехи соврем. биологии. – 1969. – Т.69, №1. – С. 3–18.

8. Богач П.Г. и др. Структура и функции биологических мембран/ Богач П.Г., Курский М.Д., Кучеренко Н.Е. – Киев: Вища шк., 1981. – 361 с.

9. Лишко Б.И., Шевченко М.И. Мембраны и жизнь клетки. – Киев: Наук. Думка, 1987. – 104 с.

10. Сим Э. Биохимия мембран. – М.: Мир, 1985. – 109 с.

11. Удилова О.Ф., Кривец И.А. Действие додецилсульфата натрия на оптическую плотность и выживаемость Pseudomonas aeruginosa – деструктора алкилсульфатов // Микробиол. Журнал, 1982, т. 45, №1. – С. 13–15.

12. Мартинек К. И др. Мицеллярная энзимология/ Мартинек К., Левашов А.В., Клячко М.Н. // Биологические мембраны. – 1985, т. 2, N7. – С. 669–695.

13. Ставская С.С. Биологическое разрушение анионных ПАВ. – Киев: Наук. думка, 1981. – 116 с.

14. Мэдди Э., Данн М. Солюбилизация мембран // Биохимическое исследование мембран. – М.: Мир, 1979. – С. 160–173.

15. Ротмистров М.Н. и др. Разрушение алкилсульфатов бактериями/ Ротмистров М.Н., Ставская С.С., Кривец И.А. // Микробиология, 1978, т. 47, N2. – С. 338–341.

16. Wachi Y., Yanagi M. Decomposition of surface active agents by bacteria siolated from deonized water. – J. Soc. Cosmet. Chem., 1980, vol. 31, №2, pp. 67–81/

17. Хотенов Д.А. Влияние ПАВ на микроорганизмы // Водные экосистемы и организмы: Материалы научной конференции. – М, 2000. – С. 85.

18. Ставская С.С. и др. Изучение продуктов разложения додецилсульфата натрия/ Ставская С.С., Кривец И.А., Самойленко Л.С. // Прикл. биохимия и микробиология, 1979, т. 15, №5. – С. 790–792.

19. Кучер Р.В. и др. Комплексное влияние поверхностно-активных веществ на процесс микробиологического окисления углеводородов/ Кучер Р.В., Дзумедзей Н.В., Хмельницкая Д.Л. // Микробиология. – 1981, т. 50, №6. – С. 1105–1108.

20. Панченко Л.В. и др. Выделение и изучение микроорганизмов – деструкторов ПАВ/ Панченко Л.В., турковская О.В., Шуб Г.М. // Микробиология. – 1981, т. 50, N6. – С. 217–222.

21. Биология и биотехнология микроорганизмов/ Под ред. Халмурадова А.Г. – Ташкент: Фак, 1992. – 220 с.

22. Литовченко П.П. Электронно-микроскопические исследования бактерии Pseudomonas // Микробиологический журнал, 1977, т. 39, №5. – С. 639–645.

23. Geele G., Garett E. Spores VI P. Gerchardt H.L. Sadoff, Costilow R.W. Washington P.S., 1975, p. 391.

24. Мосолов В.В. Протеолитические ферменты. М., Наука, 1979. – 125 с.

25. Keay L., Wildi B.S. Biotechnol et biogen, 1985, 179 p.

26. Яковлева М.Б., Козельцев В.Л. Протеолиз коллагена некоторыми видами макромицетов и спорообразующих бактерий // Прикладная биохимия и микробиология. – 1994, т. 30, выпуск 1.-С. 121–127.

27. Kerjan P. Regulation de la sporulation microbienne. Colloq. Intern. CNRS, Paris, 1973, 96 p.

28. Чюрлис Т.К., Ужкуренас А.П. Химия протеолитических ферментов. Вильнюс, 1983. – 133 с.

29. Ерохина Л.И. Материалы Всесоюзного симпозиума по химии протеолитических ферментов. Вильнюс, 1983. – 95 с.

30. Chambliss G.H., Legault Demare L. Regulation de la sporulation microbienne. J-P. Aubert (Eds). Coloq. Intern. CNRS, Paris, 1983. – 227 p.

31. Цаплина И.А. Синтез протеазы термофильной бактерией Bacillus subtilis. Канд. дис. М., 1982.

32. Pazlarova J. Produkce amilazy v jednorazove a kontinnalni kultivaci Bacillus subtilis. Dissert. Praque, 1982.

33. Микельсаар П.Ч. и др. Зависимость синтеза внеклеточных протеаз от фазы роста у Pseudomonas fluorescens/ Микельсаар П.Ч., Вили Р.О., Лахт Т.И. // Микробиология, 1982, т. 51, №2. – С. 212–215.

34. Биосинтез микроорганизмами нуклеаз и протеаз. – М.: Наука, 1990. – 275 с.

35. Fencl J., Novak M. Prediction of the product formation in continuous cultivation of microorganisms. Dept. Techn. Microbiol. Inst. Microbiol. Czechosl. Acad. Sci., Prague, 1981.

36. Дачюлите Я.А. Химия протеолитических ферментов. Рига, 1983. – 138 с.

37. Мудерризаде А. и др. Очистка и характеристика щелочной протеиназы алкалофильного штамма Bacillus sp./ Мудерризаде А., Инсари Н.Я., Агюложу С. // Прикладная биохимия и микробиология, т. 37, №6. – С. 674–677.

38. Мотина Л.И. и др. Способ получения щелочной протеиназы/ Мотина Л.И., Нахапетян Л.А., Скворцов Г.Е./ Пат. №4460547/ 31–13. Опубл. 14.07.88.

39. Зефирова О.Н., Мамаева А.В., Чупов В.В. Получение и свойства препаратов щелочной протеазы // Прикладная биохимия и микробиология, т. 32, №5. – С. 510–513.

40. Recombinate microbial lipases for biotechnological applications/ Schmidt – Dannert Claudia // Bioorg. and Med. Chem. – 1999, №10. P. 2123–2130.

41. Давранов К. Микробные липазы в биотехнологии // Прикладная биохимия и микробиология, 1994, т. 30, №4–5. – С. 527–534.

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

43. Давранов К.Д. и др. Специфичность липаз мицелиальных грибов к типу сложноэфирных связей триглицеридов/ Давранов К.Д., Халамейзер В.В., Розмухамедова Б.Х. // Прикладная биохимия и микробиология, т. 32, №3, 1996. – С. 294–297.

44. Дженсон Р., Брокерхоф Х. Липолитические ферменты. М.: Мир, 1978. – 396 с.

45. Шеланова С.А., Жеребцов Н.А. Оптимизация условий биосинтеза липазы. Ферментная и спиртовая промышленность, 1984. – С. 24–28.

46. Свириденко Ю.Я., Уманский М.С. Питательная среда для культивирования липолитических ферментов. А.С. №745945, 1980. БИ №25.

47. Вецозола А.О., Бекер М.Е. Оптимизация состава Среды для биосинтеза липазы дрожжами Candida Paralipolytica. Рига, 1988. – 200 с.

48. Звягинцева И.С. Липазная активность некоторых дрожжей. – Микробиология, 1982, т. 41, №4. – С. 24–28.

49. Ota Y., Yamada K. Lipase from Candida Paralipolytica. Agr. Biol. Chem., 1979, vol. 30, №1. – P. 351–358.

50. Ota Y. Lipids and related substances inducing the lipase production by Candida Paralipolytica. Agr. Biol. Chem., 1979, vol. 32, №3. – P. 390–391.

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

52. Корчагина Л.Н., Рудюк В.Ф., Чербанова В.Т. Липолитические ферменты для медицинских целей. 1987. Вып. 1. С. 26.

53. Определитель бактерий Берджи (в 2-х тт.)/ Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Смита, Дж. Стейли, С. Уильямма. – М.: Мир, 1997. – 432 с.

54. Макаров Г.В. и др. Охрана труда в химической промышленности/ Макаров Г.В., Ванин А.Я., Маринина Л.К. – М.: Химия, 1989. – 556 с.

55. Дроздова С.Г. Основы техники безопасности в микробиологии и вирусологических исследованиях. – М.: Медицина, 1987. – 63 с.

56. Долин П.А. Справочник по технике безопасности. – М.: Энергоатом-издат, 1984. – 556 с.

57. Печников В.Г., Якушев В.П. Влияние пенообразования в водоеме на процесс развития бактерий (E.coli). – В кн. Биофизические аспекты загрязнения биосферы. М., Наука, 1973. – С. 112–113.

58. Ротмiстров М.М. и др. Вплив синтетичних поверхнево-активних речовин на мiкроорганiзми i очистка стiчних вод/ Ротмiстров М.М., Ставьска С.С., Таранова Л.А. – Вiсн. АН УССР, 1974, №3. – С. 73–83.

59. Prochazka G.J., Payne W.J. Bacterial growth as practical indicator of extensive biodegradability of organic compounds. – Appl. Microbiol., 1975, 13, №5, p. 702–705.

60. Bogan R.H., Sawyer C.N. Biochemical degradation of synthetic detergents. I. Preliminary studies. – Sen. Ind. Wast., 1984, 26, №9. – P. 1069–1080.

61. Riesen von L. Studies on bacteria-surface active agent relationships. 2. Hydrolysis of ester linkages in anionic compounds by gramnegative species as shown by Nile-blue sulgate. – Trans. Kansas Acad. Sci., 1986, 59, №3, p. 333–338.

62. Ротмистров М.Н. и др. Быстрый метод обнаружения бактерий, разлагающих алкилсульфаты/ Ротмистров М.Н., Ставская С.С., Кривец И.А. // Прикладная биохимия и микробиология, 1977, 13, №1. – С. 147–150.

63. Davis M., Gloyna E.F. The role of algae in degrading detergent surface active agents. – J. Water Poll. Contr. Fed., 1979, 41, №8, p. 1494–1504.

64. Ставська С.С., Таранова Л.А. Бiологiчний розклад анiонних детергентiв. – Вiсн. Ан УССР, 1975, №9. – С. 87–93.

65. Willets A.J., Cain R.B. Microbial metabolism of alkylbenzene sulfonates enzyme system of bacillus species responsible for oxidation of the alkyl side chain of alkylbenzen sulfonates. – Antonie van Leeuwenhoek. J. Microbial. And Serol. 1982, 38, №4, р. 543–555.

66. Heyman J.G., Moloff Al. Biodegradation linear of alkylated sulfonates. – Environ. Sci. And Technol., 1978, 20, №2, p. 773–778.

67. Удод В.М. и др. Микроорганизмы-деструкторы ряда неионогенных ПАВ/ Удод В.М., Подорван Н.И., Венгожен Г.С., Гвоздяк П.И. // Микробиология, 1983, т. 52. Вып.3. – С. 370–374.

68. Каплин Т.В. и др. Распад синтетических неионогенных веществ в природных водоемах/ Каплин Т.В., Шлыкова В.В., Долженко Л.С. // Гидрохимические материалы, 1988, 46. – С. 189–198.

69. Трифонова Т.В. и др. Биологическое разложение неионогенных поверхностно-активных веществ/ Трифонова Т.В., Панкина А.М., Юдина Н.М./ Анилинокрасочная пром-сть, 1974, №1. – С. 67–73.

70. Лукиных Н.А. Очистка сточных вод, содержащих синтетические поверхностно-активные вещества. М., Стройиздат, 1982. – 95 с.