

Биология

УДК 579.66

DOI: 10.17277/voprosy.2017.03.pp.009-016

ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТИ КОМПЛЕКСНОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СТОЧНЫХ ВОД ДЛЯ БИОСИНТЕЗА ЛИПИДОВ И МОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ

Д. С. Дворецкий, М. С. Темнов, И. В. Маркин,
А. И. Бушковская, Я. В. Устинская,
Р. Д. Санталов, М. А. Еськова

ФГБОУ ВО «Тамбовский государственный технический
университет», г. Тамбов, Россия

Рецензент д-р техн. наук, профессор С. А. Нагорнов

Ключевые слова: биомасса; ионы аммония; липиды; микроводоросли; молочная кислота; сточные воды; фосфат-анионы.

Аннотация: Проведено экспериментальное исследование условий очистки сточных вод с помощью микроводоросли *Chlorella vulgaris*. Определена кинетика накопления биомассы штамма *Chlorella vulgaris* Beijer IPPAS C-2, кинетика убыли ионов аммония и фосфат-анионов. Проведен микробиологический анализ очищенных с помощью микроводорослей сточных вод. Определена кинетика накопления молочной кислоты в суспензии при культивировании штамма *Lactobacillus casei* B-3241 на сточных водах, очищенных с помощью микроводорослей.

Введение

Бурное развитие и рост населения городов – одна из причин стремительно возрастающих локальных нагрузок на окружающую среду. Данное обстоятельство делает проблему очистки сточных вод и повышения эффективности существующих очистных сооружений одной из важнейших. Другое направление исследований – разработка технологий культивиро-

Дворецкий Дмитрий Станиславович – доктор технических наук, профессор, ведущий кафедрой «Технологии и оборудование пищевых и химических производств», e-mail: dvoretsky@tambov.ru; Темнов Михаил Сергеевич – ассистент кафедры «Технологии и оборудование пищевых и химических производств»; Маркин Илья Владимирович – аспирант кафедры «Технологии и оборудование пищевых и химических производств»; Бушковская Анастасия Игоревна – магистрант; Устинская Яна Витальевна – студент; Санталов Роман Дмитриевич – магистрант; Еськова Мария Александровна – студент, ТамбГТУ, г. Тамбов, Россия.

вания и переработки микроводорослей, которые рассматриваются как перспективный источник сырья для производства возобновляемых источников энергии, биоразлагаемых полимеров, корма для животных и т.д. Реализация идеи интеграции материальных потоков в целях повышения уровня энерго- и ресурсосбережения наблюдается во многих отраслях промышленного производства.

В работе [1] изучена возможность культивирования микроводоросли в сточных водах сельскохозяйственного происхождения после гидропонного выращивания томатов в целях их очистки (в таких водах содержатся высокие концентрации как органических, так и неорганических соединений, а также различные гербициды и фунгициды) до уровня предельно-допустимой концентрации (ПДК). Для сравнения уровня накопления биомассы микроводорослей осуществлялось параллельное культивирование микроводорослей на сточных водах и на лабораторной питательной среде ВФ-11. В результате определено, что к концу культивирования (49 сутки) при выращивании на сточных водах получено на 25 % меньше биомассы. Концентрация клеток в первом случае составила 3,75 г/л; во втором – 5,15 г/л. Первоначальный состав тепличных сточных вод, в которых выращивались водоросли, характеризовался более высоким количеством азота и нитритов, чем ионов аммония. За время культивирования удалено 99 % азота и 94 % фосфора. Установлено, что микроводоросли оказали положительное влияние на снижение концентрации сульфатов в среде, уменьшив их количество на 26 %, наблюдалось снижение концентрации железа на 71 %. Выявлено, что рост микроводорослей возможен при наличии в среде пестицидов: небольшое увеличение роста наблюдалось при присутствии в среде ипродиона и триклопира (21 и 42 % соответственно), присутствие фенгексамида снижало скорость роста микроводорослей на 26 %, пириметанил и металаксил приводили к снижению выхода на 10 %. При этом микроводоросли показали хорошую динамику по разложению гербицидов и фунгицидов. В результате сделан вывод, что можно использовать микроводоросли *Chlorella vulgaris* для очистки сельскохозяйственных сточных вод, которые содержат неорганические соединения и пестициды.

В работе [2] исследована возможность культивирования *Chlorella vulgaris* на сточных водах, являющихся отходом молочного производства и предварительно обработанных с помощью ультрафиолетового излучения и гипохлоритом натрия, в целях получения биотоплива. Сточные воды обрабатывались с помощью ультрафиолетового излучения (УФИ) в темной комнате в течение 5, 10 и 15 мин, количество вносимого гипохлорита натрия составляло 10, 30, 50, 70 и 90 см³/м³ (частей на миллион), обработка проводилась в темной комнате в течение 12 ч, после чего остаточный хлор удалялся с помощью раствора тиосульфата натрия. В результате экспериментов наибольшие концентрации биомассы (г/л) и продуктивность биомассы по липидам (г/л·день) отмечены после обработки сточных вод УФИ в течение 15 мин или использовании гипохлорита натрия в концентрации в 70 см³/м³. Кроме того, отмечено увеличение аммиачного азота в среде после данных типов обработки, а общее количество фосфора незначительно снижалось. После четырех дней культивирования микроводоросли на обработанных средах количество фосфора снижалось более чем на 90 %, азота – на 60 – 90 %.

Анализ литературных источников позволяет сделать вывод, что сточные воды могут быть использованы в качестве питательной среды для культивирования микроводорослей.

Объект настоящего исследования – муниципальные сточные воды, которые использовались в качестве питательной среды для культивирования микроводорослей *Chlorella vulgaris* и являются перспективным источником липидов [3, 4]. Культуральная жидкость, которая остается после культивирования данного штамма, содержит большое количество ценных питательных веществ, что позволяет использовать ее для культивирования молочнокислых бактерий – продуцентов молочной кислоты [5].

Цель исследования – оценка возможности комплексного использования сточных вод для биосинтеза липидов и молочной кислоты.

Для достижения цели поставлены и решены следующие задачи:

- 1) определение возможности очистки муниципальных сточных вод от загрязняющих веществ, содержащих азот и фосфор, микроводорослями;
- 2) определение микробиологических показателей очищенной воды;
- 3) исследование возможности извлечения липидов из биомассы микроводорослей;
- 4) исследование возможностей использования фильтрата культуральной жидкости микроводорослей в качестве питательной среды для биосинтеза молочной кислоты.

Методы и материалы

Использовались образцы муниципальных сточных вод, взятых на городских очистных сооружениях: *образец № 1* – вода, поступившая на очистные сооружения (содержат количество азота (total nitrogen) TN \approx 61 мг/л и фосфора (total phosphorus) TP \approx 38 мг/л); *образец № 2* – вода, поступившая на очистные сооружения после первичного отстойника (TN \approx 32 мг/л и TP \approx 11 мг/л).

Культивирование и концентрирование биомассы микроводорослей. Для оценки эффективности очистки сточных вод (образцы № 1, 2) использовался штамм микроводорослей *Chlorella vulgaris* Beijer IPPAS C-2. Культивирование проводилось в фотобиореакторе емкостью 2 л в течение девяти дней, при температуре 20...22 °С и среднем уровне освещенности \approx 250 мкмоль фотонов/(м²·с). Количество азота определялось согласно ГОСТ 33045–2014 «Вода. Методы определения азотсодержащих веществ»; фосфора – согласно ПНД Ф 14.1; 4.248–07 «Количественный химический анализ вод. Методика выполнения измерений массовых концентраций ортофосфатов, полифосфатов и фосфора». Концентрация клеток в суспензии определялась с использованием камеры Горяева и светового микроскопа Levenhuk C310 NG (\times 1000 – 1600). Концентрирование клеток микроводорослей до влажности 95 – 98 % проводилось с использованием центрифуги с фактором разделения 1000 в течение 5 мин.

Разрушение клеток микроводорослей и экстракция липидов. Разрушение клеток осуществлялось путем воздействия на 100 мл биомассы микроводорослей влажностью 98 % комплексом ферментных препаратов «Целлолюкс А» и «Протосубтилин ГЗх», взятых в соотношении – 75 % : 25 % (0,012 мг/мл – 0,004 мг/мл) в течение 10 мин при температуре \approx 50 °С, а затем СВЧ-излучением мощностью 280 Вт в течение 40 с.

Экстракция липидов из клеток микроводорослей выполнялась аналогично методу Блая и Дайера, но с использованием этанола и петролейного эфира в соотношении 2:1 (об.) в течение 110...120 мин при температуре 50 °С, при соотношении сухих веществ биомассы (г) к количеству смеси экстрагентов (мл) $R = 1:20$; дистилляция растворителей с использованием ротторного испарителя IR-1 М3 при температуре дистилляции 85 °С; определение общих липидов – по методу Цоллнера и Кирша.

Санитарно-бактериологическое исследование сточной воды. Образцы сточной воды (разбавленные в 0 – 100 000 раз) в количестве 0,1 мл вносятся в чашки Петри, в которых находится питательная среда МПА и Эндо для определения бактерий группы кишечной палочки. Посевы ставили в термостат и инкубировали при 37 °С в течение 24 ч. Через 24 ч чашки Петри с посевами вынимают из термостата и подсчитывают число выросших колоний. Используя формулу (1), определялось число бактерий в 1 мл воды (для расчета учитываются чашки Петри, число колоний в которых находится в пределах 3...300).

$$M = \frac{a 10^n}{V}, \quad (1)$$

где M – число клеток в 1 мл; a – среднее число колоний в чашке Петри; V – объем суспензии, взятый на посев, мл; 10^n – разведение.

Культивирование *Lactobacillus casei* B-3241. Для получения молочной кислоты использовали штамм *Lactobacillus casei* B-3241, который культивировали в емкостях объемом 0,5 л на культуральной жидкости, полученной после культивирования микроводоросли *Chlorella vulgaris* на сточных водах (образцы № 1, 2). В качестве источника редуцирующих веществ использовалась свекловичная меласса. Начальное содержание редуцирующих веществ в растворе составляло 5 % об., температура культивирования 37 °С, начальный уровень pH = 7. Культивирование проводилось в течение 5 дней.

Экспериментальное исследование условий культивирования биомассы *Chlorella vulgaris*

Анализ химического состава муниципальных сточных вод позволяет предположить целесообразность их использования в качестве питательной среды для производства биомассы микроводорослей с последующей их переработкой в технические липиды, так как там присутствуют необходимые элементы, требующиеся для жизнедеятельности микроводорослей.

Культуральная жидкость, получающаяся после отделения биомассы, содержит аммонийные соли, аминокислоты, витамины группы В, кобальт, медь, марганец, молибден, железо, цинк, йод и другие микроэлементы. Данные компоненты оказывают стимулирующее воздействие на молочнокислые бактерии, поэтому проведено исследование возможности ее использования для получения молочной кислоты с использованием бактерий *Lactobacillus casei* B-3241.

Анализ экспериментальных данных по культивированию штамма микроводорослей *Chlorella vulgaris* Beijer IPPAS C-2 (рис. 1 – 3) показал, что максимальный прирост биомассы на сточных водах наблюдался на девятые сутки культивирования. При этом для образца № 1 количество

клеток микроводорослей достигло ≈ 23 млн кл./мл, концентрации азота и фосфора снизились на 85 и 79 % соответственно. Для образца № 2 количество клеток микроводорослей составило ≈ 9 млн кл./мл, концентрации азота и фосфора снизились на 72 и 90 %, соответственно. Концентрация биогенных элементов в получившейся культуральной жидкости достаточна для культивирования штамма молочнокислых бактерий *Lactobacillus casei* B-3241.

Для получения биомассы с повышенным содержанием липидов необходимо осуществлять культивирование микроводорослей в стрессовых условиях (при низком содержании в сточных водах азота и фосфора) в течение пяти-шести суток [4].

Эксперимент по экстракции липидов из микроводорослей, выращенных на сточных водах при комплексном разрушении клеток [4] позволил сделать вывод, что максимальное количество липидов, которое возможно извлечь из биомассы штамма *Chlorella vulgaris* Beijer IPPAS C-2, выращенной на сточных водах (образцы № 1, 2), составляет ≈ 26 % (масс.).

Использование для очистки сточных вод микроводорослей также позволяет уменьшить обсемененность воды микроорганизмами (условно патогенными и патогенными). Общее микробное число (ОМЧ) при использовании микроводорослей уменьшается в 4,5 раза (40 КОЕ/мл) по сравне-

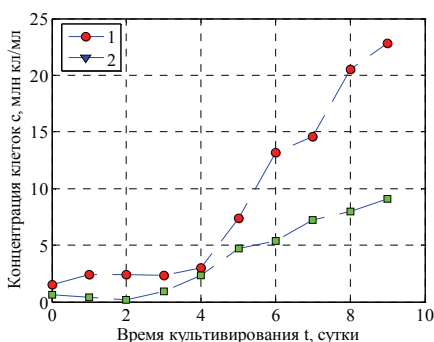


Рис. 1. Кинетика роста *Chlorella vulgaris* Beijer IPPAS C-2 на сточных водах

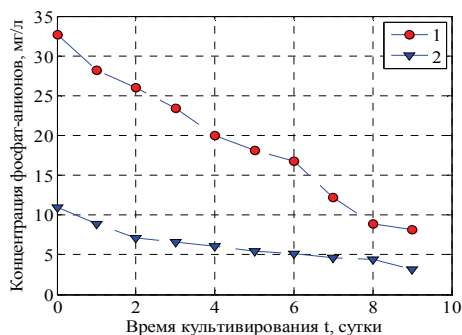


Рис. 2. Изменение фосфат-анионов в сточных водах при культивировании *Chlorella vulgaris* Beijer IPPAS C-2

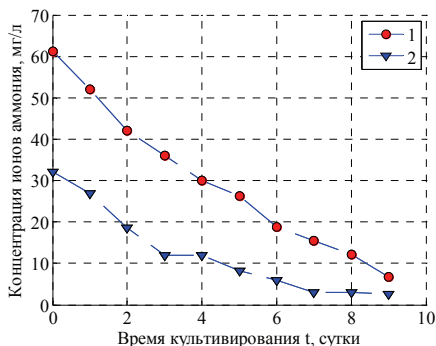


Рис. 3. Изменение катионов аммония в сточных водах при культивировании *Chlorella vulgaris* Beijer IPPAS C-2

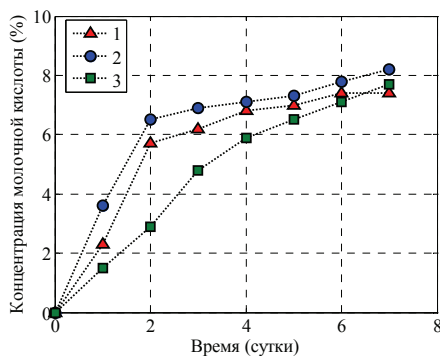


Рис. 4. Кинетика накопления в культуральной жидкости молочной кислоты

нию с контролем (180 КОЕ/мл) и в 3 раза по сравнению с водой, очищенной с помощью активного ила (120 КОЕ/мл). Гибель микрофлоры сточных вод наблюдается из-за того, что микроводоросли выделяют в суспензию вещество, обладающее антибиотическим эффектом [6], но перед сбросом в реку вода, очищенная микроводорослями, также нуждается в дополнительной дезинфекции (химической обработкой, с использованием УФ и пр.). После отделения биомассы микроводорослей очищенные сточные воды (1 – поступающие на очистные сооружения; 2 – после осаждения крупных частиц; 3 – культуральная жидкость после культивирования на питательной среде *Тамия OPTIMUM*) и меласса использовались для культивирования бактерий *Lactobacillus casei B-3241* при лабораторном производстве молочной кислоты. Максимальный выход молочной кислоты 8,2 % (об.) наблюдался на седьмые сутки культивирования (рис. 4) при использовании сточной воды, поступающей на очистные сооружения (1), что можно объяснить тем, что в данном виде сточных вод осталось большее количество аммонийного азота (см. рис. 3, кривая 1).

По результатам проведенных экспериментальных исследований можно предложить технологию биосинтеза липидов и молочной кислоты с использованием сточных вод (рис. 5), которая предусматривает культивирование штамма микроводорослей *Chlorella vulgaris Beijer IPPAS C-2* на муниципальных сточных водах, поступивших на очистные сооружения, в течение девяти дней при температуре 20...22 °С и среднем уровне освещенности ≈ 250 мкмоль фотонов/(м²·с). На девятые сутки концентрация клеток микроводорослей достигает концентрации ≈ 23 млн кл./мл, концентрация азота и фосфора в воде снижается на 85 и 79 % соответственно. Концентрирование биомассы микроводорослей может осуществляться с использованием центрифуги с фактором разделения 1000 в течение 5 мин. Разрушение клеток необходимо проводить путем воздействия на биомассу микроводорослей влажностью 98 % комплексом ферментных препаратов «Целлолюкс А» и «Протосубтилин Г3х», взятых в соотношении – 75 % : 25 % (0,012 – 0,004 мг/мл) в течение 10 мин при температуре ≈ 50 °С, а затем СВЧ-излучением мощностью 280 Вт в течение 40 с. Экстракцию липидов из клеток микроводорослей целесообразно проводить с использованием этанола и петролейного эфира в соотношении 2 : 1 (об.) [4].

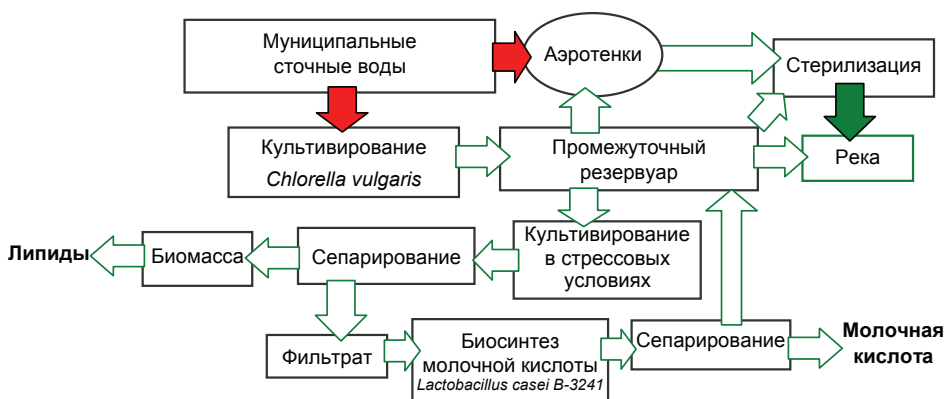


Рис. 5. Возможная схема использования сточных вод для биосинтеза липидов и молочной кислоты

Фильтрат культуральной жидкости, отделенной от клеток микроводорослей, может быть использован как основа питательной среды для культивирования бактерий *Lactobacillus casei B-3241*, что позволит уменьшить себестоимость молочной кислоты. Фильтратом культуральной жидкости проводят рассиропку мелассы до содержания редуцирующих веществ 5 %. Рассиропка проходит без стерилизации, так как термическая обработка разрушает витамины группы В, содержащиеся в фильтрате и необходимые для жизнедеятельности продуцентов молочной кислоты – бактерий *Lactobacillus casei B-3241*.

Заключение

По результатам проведенных экспериментальных исследований можно сделать вывод, что поступающие на очистные сооружения муниципальные сточные воды можно без предварительной обработки и разбавления использовать в качестве питательной среды для культивирования микроводорослей штамма *Chlorella vulgaris Beijer IPPAS C-2*. Культивирование данного штамма в течение девяти дней позволяет накопить биомассу клеток концентрацией 23 млн кл/мл суспензии с внутриклеточным содержанием липидов 26 %, при этом концентрация общего азота и фосфора в воде уменьшается в среднем на 85 и 79 % соответственно. Биомасса микроводорослей, отделенная от культуральной жидкости, может служить сырьем для получения биотоплива. Отделенная культуральная жидкость может служить основой питательной среды (с добавлением свекловичной мелассы) для культивирования бактерий *Lactobacillus casei B-3241*, которые являются продуцентом молочной кислоты. При этом на седьмые сутки культивирования накапливается 8 % молочной кислоты (нейтрализация не проводилась). Данная кислота после отделения от культуральной жидкости может служить сырьем для получения биополимеров.

Список литературы

1. Cultivation *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus quadricauda* Microalgae to Degrade Inorganic Compounds and Pesticides in Water / A. Baglieri [et al.] // Environmental Science and Pollution Research. – 2016. – Vol. 23, No. 18. – P. 18165 – 18174. doi: 10.1007/s11356-016-6996-3
2. Cultivation of *Chlorella vulgaris* in Dairy Wastewater Pretreated by UV Irradiation and Sodium Hypochlorite // L. Qin [et al.] // Applied Biochemistry and Biotechnology. – 2013. – Vol. 172. – P. 1121 – 1130.
3. Optimization of the Process of Cultivation of Microalgae *Chlorella Vulgaris* Biomass with High Lipid Content for Biofuel Production / D. S. Dvoretzky [et al.] // Chemical Engineering Transactions. – 2015. – No. 43. – P. 361 – 366.
4. Дворецкий, Д. С. Технология получения липидов из микроводорослей : [Электронный ресурс] / Д. С. Дворецкий, С. И. Дворецкий, М. С. Темнов. – Тамбов : Изд-во ФГБОУ ВПО «ТГТУ», 2015. – 1 эл. опт. диск (CD-ROM).
5. Совершенствование условий биосинтеза молочной кислоты лактобактериями / Д. С. Дворецкий [и др.] // Вестн. Казан. технол. университета. – 2017. – Т. 20, № 8. – С. 126 – 130.
6. Pratt, R. Studies on *Chlorella vulgaris*. X. Influence of the Age of the Culture on the Accumulation of Chlorellin / R. Pratt, J. F. Oneto, J. Pratt // American Journal of Botany. – 1945. – Vol. 32, No. 7. – P. 405 – 408.

References

1. Baglieri A., Sidella S., Barone V., Fragala F., Silkina A., Negre M., Gennari M. Cultivation *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus quadricauda* microalgae to degrade inorganic compounds and pesticides in water, *Environmental Science and Pollution Research*, 2016, Sep; 23(18):18165-74, doi: 10.1007/s11356-016-6996-3
2. Qin L., Shu Q., Wang Z., Shang C., Zhu S., Xu J., Li R., Zhu L., Yuan Zh. Cultivation of *Chlorella vulgaris* in dairy wastewater pretreated by UV irradiation and sodium hypochlorite, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2013, vol. 172, pp. 1121-1130.
3. Dvoretzky D., Dvoretzky S., Peshkova E., Temnov M. Optimization of the Process of Cultivation of Microalgae *Chlorella Vulgaris* Biomass with High Lipid Content for Biofuel Production, *Chemical Engineering Transactions*, 2015, no. 43, pp. 361-366, doi: 10.3303/CET1543061
4. Dvoretzky D.S., Dvoretzky S.I., Temnov M.S. *Tekhnologiya polucheniya lipidov iz mikrovdoroslei* [Technology of obtaining lipids from microalgae], Tambov: Izdatel'stvo FGBOU VPO "TGTU", 2015. (In Russ.)
5. Dvoretzky D.S., Zyuzina O.V., Markin I.V., Kozodaeva M.V., Ustinskaya Ya.V. [Improvement of lactic acid biosynthesis conditions with lactobacilli], *Vestnik Kazanskogo tekhnologicheskogo universiteta* [Bulletin of Kazan Technological University], 2017, vol. 20, no. 8, pp. 126-130. (In Russ.)
6. Pratt R., Oneto J. F., Pratt J. Studies on *Chlorella vulgaris*. X. Influence of the Age of the Culture on the Accumulation of Chlorellin, *American Journal of Botany*, 1945, vol. 32, no. 7, pp. 405-408.

Assessment of the Possibility of Integrated Use of Wastewater for Biosynthesis of Lipids and Lactic Acid

**D. S. Dvoretzky, M. S. Temnov, I. V. Markin,
A. I. Bushkovskaya, Ya. V. Ustinskaya,
R. D. Santalov, M. A. Eskova**

Tambov State Technical University, Tambov, Russia

Keywords: ammonium ions; biomass; lactic acid; lipids; microalgae; phosphate anions; wastewater.

Abstract: An experimental research into the conditions of wastewater treatment with microalgae *Chlorella vulgaris* has been conducted. The kinetics of *Chlorella vulgaris* Beijer IPPAS C-2 biomass accumulation and the loss of ammonium ions and phosphate anions has been determined. The microbiological analysis of wastewater treated by microalgae has been performed. The study also defines the kinetics of lactic acid accumulation in suspension during the cultivation of *Lactobacillus casei* B-3241 in wastewater after algal treatment.

© Д. С. Дворецкий, М. С. Темнов, И. В. Маркин, А. И. Бушковская,
Я. В. Устинская, Р. Д. Санталов, М. А. Еськова, 2017