

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОГО РАЗЛОЖЕНИЯ НИТРОЦЕЛЛЮЛОЗЫ ГРИБАМИ *FUSARIUM SOLANI*

В. А. Хрячков¹, Е. А. Саратовских^{2*}, Р. Н. Яруллин³

¹Федеральное казенное предприятие Научно-исследовательский институт «Геодезия», г. Красноармейск, Московская обл., Россия

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт проблем химической физики Российской академии наук, г. Черноголовка Московской области, Россия
*e-mail: easar@icp.ac.ru

³Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Поступила в редакцию 30.03.2017 г.

Представлены результаты решения проблемы очистки промышленных стоков производства нитроцеллюлозы (НЦ) методом биodeградации. Цель исследования состояла в подборе микроорганизма (ов) или их сочетаний, способных в максимальной степени и в предельно короткие сроки окислить стойкий биополимер – НЦ. В настоящей работе отходы НЦ с содержанием азота N 13,38 масс.% подвергали биологическому окислению с помощью мицелиального гриба *Fusarium solani*. Время инкубации образцов на *F. solani* составляло 5, 16, 38 и 65 суток. Максимальное снижение содержания N составило ~3%; максимальная концентрация образования нитратов NO₃⁻ в растворе была 11,40 мкг/мл; рН сдвигался в кислую область. Молекулярная масса образцов существенно снижалась: с 324216 у исходного образца до 37300. Тепловыделение снизилось до 770 кал/г за 36 суток по сравнению с 975 кал/г у исходного образца. Наибольшие изменения наблюдались за первые 5 и 16 суток инкубации, что можно считать перспективным с точки зрения практического применения.

Ключевые слова: нитроцеллюлоза, биологическое окисление, *Fusarium solani*, очистка промышленных стоков.

ВВЕДЕНИЕ

Производство нитрованной целлюлозы (НЦ) сопряжено со значительным количеством пожаро- и -взрывоопасных отходов. В настоящее время очистка стоков производства НЦ является серьезной экологической проблемой. Известно [1, 2], что в условиях средней климатической полосы в естественных условиях НЦ микроорганизмами и грибами полностью не разлагается, а подвергается деструкции лишь в небольших концентрациях. Устойчивость НЦ к биологическому разложению приводит к накоплению этих отходов в прудах-отстойниках, что оказывает негативное воздействие как на состояние окружающей среды, так и на здоровье людей. Поэтому поиски эффективных микроорганизмов-деструкторов и разработка метода биологического

разложения стоков производства НЦ являются актуальными научными и хозяйственными задачами.

В предыдущей работе [3] нами было исследовано разложение НЦ с помощью сульфатредуцирующих бактерий *Desulfovibrio desulfuricans*. Однако, ни достигнутая с их помощью степень разложения, ни снижение тепловыделения не отвечают требованиям крупнотоннажных технологических процессов.

Исходя из особенностей целлюлозной промышленности, применение грибов в качестве альтернативного метода разложения НЦ требует, чтобы грибы были способны к метаболизму лигнина и его производных; микроорганизм должен быстро расти, конкурентно преобладать в окружающей среде. Этим требованиям соответствуют, например, грибы белой гнили, в частности *Fusarium solani* [4, 5].

Целью настоящей работы является исследование биологического окисления НЦ с помощью мицелиального гриба *F. solani* ВКМ F-819.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реактивы. Для приготовления культуральных питательных сред, буферных систем и выполнения физико-химических исследований использовали реагенты и растворители производства фирм Sigma (США), BioRad (США) и Реахим (Россия): KCl, NH₄Cl, CaCl₂, K₂HPO₄, MgCl₂·6H₂O, NaNO₃, Са лактат, Na салицилат; NaOH, глюкозу, тетрагидрофуран (ТГФ), ацетон.

Использовали образцы НЦ, предоставленные Казанским пороховым заводом, с содержанием азота 13,38% (масса элементарного звена макромолекулы 284,4; степень полимеризации 1140; молекулярная масса 324216) согласно ГОСТ Р 50461-92.

Грибы. В работе использовали мицелиальный гриб – *Fusarium solani* ВКМ F-819, полученный из Всероссийской коллекции микроорганизмов из ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН. Для экспериментов *Fusarium solani* ВКМ F-819 выращивали в пробирках со скошенным мальтозным агаром при температуре 24-25°C.

Приготовление питательной среды для биodeградации НЦ. Для приготовления культуральной питательной среды с целью изучения биodeградации НЦ в двух литрах дистиллированной воды растворялись следующие соли: KCl – 5,0 г; NH₄Cl – 10 г; CaCl₂ – 1 г; K₂HPO₄ – 10 г; MgCl₂·6H₂O – 20 г. Далее дробно добавлялись: дрожжевой экстракт – 10 г; лактат Са – 60 мл и глюкоза – 20 г. Полученный концентрат культуральной питательной среды разбавлялся в соотношении 1 : 4 дистиллированной водой.

Культивирование клеток гриба. Необходимое для культивирования количество клеток гриба *Fusarium solani* ВКМ F-819 методом смыва с косяков вводилось в лабораторные аэротенки. В течение всего эксперимента поддерживалась температура инкубации гриба 27-29°C, как наиболее благоприятная для размножения клеток данного вида.

Биологическое окисление НЦ. Эксперименты по изучению биологического окисления НЦ проводили в лабораторных стеклянных реакторах объемом 3 л при естественном солнечном освещении без продува воздухом, аналогично [3]. Использовали два образца, содержащих культуру мицелиального гриба *Fusarium solani* ВКМ F-819 в количестве 3 x 2 косяка, каждый. Затем эти образцы разбавляли в лабораторных закрытых реакторах культуральной питательной средой до 500 мл.

В оба образца вводили НЦ в концентрации 5 г/л.

Образец № 1 – исходная НЦ, содержание азота – 13,38%.

Пробы для анализа отбирали на 5, 16, 38 и 65 сутки от начала эксперимента, в объеме 50 мл после механического перемешивания раствора. Время отбора каждого последующего образца определяли после анализа и обработки результатов предыдущего отбора.

Количественное определение НЦ. Количество НЦ определяли весовым методом, аналогично [3]. Из каждого лабораторного реактора регулярно отбирали пробы по 50 мл. Осадок из культуральной жидкости, содержащий бактериальные клетки, нерастворимые соли, частицы НЦ, отделяли центрифугированием при 7000 об/мин в течение 20 мин на ультрацентрифуге Optima L-90K производства фирмы «Beckman» (США). Затем дважды отмывали дистиллированной водой, высушивали до постоянного веса при 105°C. Сухой осадок обрабатывали ацетоном в количестве 50 мл и оставляли на 2 часа при 40°C для достижения предельной полноты растворения НЦ в ацетоне. НЦ из раствора в ацетоне отделяли центрифугированием при 7000 об/мин в течение 15 мин, сливали в круглодонные фарфоровые чашки и упаривали на 50% объема при 40°C. Затем по каплям добавляли водно-спиртовую смесь (1 : 2) для осаждения НЦ. Высушивали до постоянного веса в термощкафу при 40°C и определяли вес НЦ.

Определение азота в НЦ. Содержание С, Н, N, S в выделенных и высушенных образцах выполняли на CHNS/O элементном анализаторе Vario MICRO cube, производства фирмы «Elementar GmbH» (Германия). Использовали навеску 0,01 г, в соответствии с инструкцией прибора. Во всех проанализированных образцах наличие серы не было зафиксировано.

Определение нитрат ионов. Анализ содержания нитрат-ионов в растворе культуральной жидкости выполняли фотометрическим методом. Фотометрические измерения проводили на фотоколориметре КФК-2МП производства ЗАО НПО «Техноком» (Россия). Нитрат-ионы определяли измерением светопоглощения при длине волны $\lambda = 400$ нм в кювете толщиной 2 см относительно воды (модифицированный метод Лурье [6-8]). Содержание нитрата устанавливали по градуировочному графику, для построения которого использовали рабочий раствор NaNO_3 , содержащий 13,8 мкг/см³ нитрата. Уравнение градуировочного графика имеет вид:

$$A = 0,033 + 0,0198m,$$

где m – масса внесенного нитрат-иона, мкг; A – оптическая плотность.

Рабочий раствор нитрата и раствор салицилата натрия (0,5 масс.%) готовили непосредственно перед употреблением. Перед проведением измерений образцы фильтровали через сухой фильтр «синяя лента» в сухую посуду.

Определение нитритов. Измерение количества нитрит-ионов в растворе культуральной жидкости выполняли фотометрическим методом на фотоколориметре КФК-2МП производства ЗАО НПО «Техноком» (Россия). Нитрит-ион определяли измерением светопоглощения красно-фиолетового азокрасителя (диазосоединения) при длине волны $\lambda = 540$ нм в кювете толщиной 5 см относительно воды. Азокраситель образуется в присутствии α -нафтиламина и сульфаниловой кислоты (модифицированный метод Лурье [6-8]). Содержание нитрита устанавливали по градуировочному графику, который строили по свежеприготовленному раствору NaNO_2 , содержащему $10,4 \text{ мкг/см}^3$ нитрита. Уравнение градуировочного графика имеет вид:

$$A = 0,127m,$$

где m – масса внесенного нитрит-иона, мкг; A – оптическая плотность.

Аликвотную часть пробы воды вносили в мерную колбу вместимостью 25 мл, добавляли воду до объема 7 мл и добавляли 0,2 мл 10%-ного (масс.) раствора реактива Грисса, нагревали колбу на кипящей водяной бане 2 мин. Охлаждали под струей воды, имеющей температуру 14-16°C, и фотометрировали при $\lambda = 540$ нм в кювете толщиной 5 см.

Определение вязкости. Определение вязкости растворов НЦ выполняли на вискозиметре Штабингера SVM 3000/G2, производства компании «Anton Paar GmbH» (Австрия) со встроенным программным обеспечением Xsample 360/460. Навеску НЦ 0,1 г растворяли в 5 мл ацетона и шприцем вводили в измерительную ячейку прибора. Измерения проводили при 20°C. Измеряли абсолютную и динамическую вязкость, а также плотность растворов НЦ в ацетоне. Выполняли три независимых повторных измерения вязкости одного и того же образца.

Определение молекулярно-массового распределения НЦ. Молекулярно-массовое распределение (ММР) полимеров анализировали методом эксклюзионной хроматографии на гель-хроматографе марки GPCV 2000 производства фирмы «Waters Alliance» (США), снабженного рефрактометрическим и вискозиметрическим детекторами. Использовали две последовательно соединенные колонки PLgel 5 μm MIXED-C, элюент – ТГФ, скорость потока 1 мл/мин, температура 35°C. Образцы полимеров растворяли в ТГФ в концентрации 1-2 мг/мл, фильтровали раствор через фильтр PTFE Anator25 размером 0,2 мкм, производства фирмы «Whatman» (Германия). Молекулярную массу полимеров определяли на основе калибровки по полистирольным стандартам с узким ММР. Использовали программное обеспечение, разработанное фирмой «Empower» (США). Все образцы бесцветные, хорошо растворимы в ТГФ.

Определение тепловыделения. Исследование кинетики тепловыделения при термическом разложении образцов продуктов утилизации НЦ проводили

на автоматическом дифференциальном микрокалориметре ДАК-1–2 [9] при 139,8°С в стеклянных, предварительно вакуумированных и запаянных ампулах с внутренним объемом около 2 см³, не имеющих холодных частей, что позволяет сохранять все продукты превращения в зоне реакции. Навеска исследуемого вещества, если специально не оговорено, составляла 10 мг.

При проведении эксперимента реализуется подход всеобъемлющего контроля за проводимой реакцией; определение изменения всех параметров от времени протекания процесса. Такая технология выполнения экспериментов позволит оценить степень разложения НЦ под действием мицелиального гриба *Fusarium solani*, дать оценку механизму протекающего биологического окисления, а также, что особенно ценно, установить технологические параметры при промышленном применении (как то – температура процесса и время инкубации).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В таблице 1 представлены результаты измерений, выполненных в процессе инкубации НЦ на *Fusarium solani*. Видно, что по мере увеличения времени инкубации происходит незначительное и неравномерное смещение рН в кислый диапазон. Это связано, в первую очередь со сложной глобулярной запутанной вторичной и третичной структурой НЦ. По-видимому, микроорганизмам трудно попасть в глубоко лежащие слои НЦ, их действие, скорее всего, ограничивается поверхностными слоями.

Таблица 1. Содержание в НЦ азота, углерода, водорода, нитрат- и нитрит-ионов в среде роста в процессе биодеградации мицелиальным грибом *F. solani*

№ образца	Время воздействия, сутки	рН	Содержание				
			С, масс.%	Н, масс.%	N, масс.%	NO ₃ ⁻ , мкг/мл	NO ₂ ⁻ , мкг/мл
1 (исх.)	0	7,0			13,38		
1'	5	7,80	30,19	3,833	11,76	11,40	3,34
1''	16	8,40	25,14	2,686	10,61	5,15	0,52
1'''	38	5,56	26,34	3,228	10,51	2,78	0,22
1''''	65	6,53	25,90	2,849	11,78	4,04	0,42

Изменение содержания азота также происходит неравномерно. Наименьшие значения установлены на 16 и 38 сутки инкубации. Падение содержания азота составляет 2,77 и 2,87%, соответственно.

Очевидно, что по мере выделения азота происходит образование нитрат- и нитрит-групп. Измеренные в растворе значения концентраций этих групп приведены в табл. 1. Закономерно, что изменения концентрации нитрат- и нитрит-групп происходят симбатно. Максимальное количество NO₃⁻ и NO₂⁻ выделяется в первые 5 суток инкубации: 11,40 и 3,34 мкг/мл, соответственно. В дальнейшем, при увеличении времени инкубации до 16 – 65 суток происходит снижение измеряемых концентраций обеих групп. Так, на 16-е сутки концентрация нитрат-групп падает в 2,2 раза, а нитрит-групп в 6,4 раз. На 38-е

сутки содержание нитратов и нитритов еще ниже. Наблюдаемый рост концентраций на 65 сутки инкубации НЦ на грибах – не меняет общей картины, - содержание NO_3^- и NO_2^- остается ниже, чем на 16 сутки инкубации. Тот факт, что изменения концентрации нитрат- и нитрит-групп происходят симбатно с колебаниями pH в растворе, указывает на то, что параллельно с отделением NO_3^- и NO_2^- в растворе под действием *F. solani* происходят другие химические процессы.

В табл. 2 приведены значения вязкости растворов и параметры молекулярно-массового распределения образцов НЦ от времени инкубации на *F. solani*. Процесс биологического окисления НЦ может происходить двумя путями – отщеплением групп NO_2^- и разрывом связи С-С. Если содержание нитрат- и нитрит- ионов может служить доказательством протекания первого направления реакции, то изменение вязкости, очевидно, связано с изменением молекулярного веса НЦ и может продемонстрировать способность микроорганизмов расщеплять эту связь. Из таблицы 2 видно, что под действием *F. solani* происходит незначительное увеличение вязкости растворов от времени инкубации. Это может быть связано с изменением конформации молекулярных цепей. Как правило, непропорциональный рост вязкости свидетельствует об увеличении объема дисперсной фазы раствора НЦ за счет гидратации. Поскольку макромолекулы в растворе находятся в виде клубков, включающих большой объем растворителя, то объем этого растворителя, пространственно связанного с полимером, также относится к объему дисперсной фазы. Следовательно, под действием грибов *F. solani* происходит изменение структуры полимера, его конформации, позволяющее дополнительному объему растворителя оказываться внутри глобул макромолекул НЦ и тем самым увеличивать их объем. В нашем случае, это приводит к увеличению вязкости раствора НЦ [10].

Таблица 2. Изменение вязкости и молекулярно-массового распределения НЦ в процессе биодеградации *F. solani*

Образец	Время обработки, сутки	Вязкость		M_n	M_w
		Абсолютная, сПз	Динамическая, сСт		
1	0	0,035	-	-	324216
1'	5	2,413	3,011	15100	48800
1''	16	2,314	2,884	16100	37300
1'''	65	2,527	3,148	20000	60900

Одной из важнейших характеристик полимера является молекулярно-массовое распределение. Молекулярная масса исходной НЦ составляла 324216. В процессе исследования биологического разложения НЦ, для каждой отобранной пробы были определены: среднечисленная молекулярная масса (M_n); средневесовая молекулярная масса (M_w). Как видно из табл. 2, величины этих показателей демонстрируют наличие незначительных количеств

низкомолекулярных фракций, процентное содержание которых мало изменяется от времени инкубации на *F. solani*.

Принципиальное значение для оценки степени разложения НЦ имеет величина тепловыделения. На рис. 1 представлены полученные зависимости скорости тепловыделения от времени инкубации. Процесс разложения как исходной НЦ, так и НЦ, подвергнутой микробиологической обработке, а затем выделенной ацетоном из раствора, протекает по закону автокаталитической реакции. Слабая зависимость начальной скорости тепловыделения, максимальной скорости тепловыделения, времени ее достижения и полной теплоты процесса (рис. 1) от времени инкубации на *F. solani* показывает, что во фракции НЦ, растворившейся в ацетоне, содержание азота мало отличается от его количества в исходной НЦ.

Полная теплота тепловыделения исходной НЦ составляет в среднем около 975 кал/г, а у НЦ после инкубации на *F. solani* в течение 36 суток - 770 кал/г, что представляет существенную разницу. Более длительная инкубация не приводит к повышению величины тепловыделения (рис. 1).

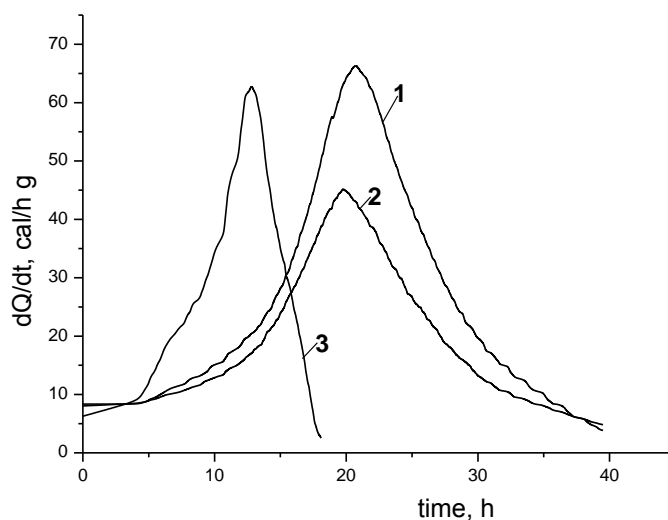


Рис. 1. Зависимость скорости тепловыделения при термическом разложении образцов НЦ от времени при 139,8°С: 1 – исходная НЦ; 2 – НЦ при инкубации на *F. solani* 36 суток; 3 – НЦ при инкубации на *F. solani* 65 суток.

Сравнивая этот результат с данными нашей предыдущей работы [3], можно сказать что инкубация НЦ на грибах *F. solani* приводит к меньшей теплоте термического разложения, а следовательно, и меньшему содержанию азота в НЦ, растворившейся в ацетоне, т.е. воздействие примененного в этой работе типа микроорганизмов на НЦ более существенное.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные в ходе выполнения работы результаты показывают, что инкубирование нитроцеллюлозы на культуре мицелиального гриба *Fusarium solani* ВКМ F-819 позволяет достичь высокой степени окисления. В процессе инкубации происходит уменьшение содержания азота на 3% и существенное

уменьшение молекулярной массы, изменяется структура полимера; значительно уменьшается величина тепловыделения. Все это указывает на значительную степень биodeградации НЦ в процессе инкубации на *Fusarium solani*. Следует отметить, что наблюдаемые изменения значительно более существенные, чем при инкубации НЦ на *Desulfovibrio desulfuricans* [3] за соответствующие промежутки времени. Однако максимальный эффект достигается за первые 16 суток инкубации и дальнейшее увеличение времени не приводит к возрастанию степени воздействия. Безусловно, биологические методы очистки промышленных стоков являются наиболее перспективными в силу их экологической безопасности. Поэтому следует продолжать работы, направленные на создание вариантов биологической очистки промышленных стоков НЦ, применение которых способно удовлетворять требованиям промышленных крупнотоннажных производств.

Список литературы:

1. Романова С.М., Трескова В.И., Шулаев М.В. // Вестник КНИТУ. 2011. № 22. С. 68.
2. Brodman B.W., Devine M.P. // Journal of Applied Polymer Science. 1981. V. 26. No 3. P. 997.
3. Saratovskikh E.A., Kazakov A.I., Kulikov A.V. et al. // Russian Journal of General Chemistry, 2016. V. LX. No. 4. P. 106.
4. Sundaram S.T., Zhang Y.Z., Sharma A. et al. // Journal of Applied Polymer Science. 1995. V. 58. No. 12. P. 2287.
5. Sharma A., Sundaram S.T., Zhang Y.-Z. et al. // Journal of Industrial Microbiology (J. Ind. Microbiol. Biotechnol.). 1995. V. 15. P. 1.
6. Лурье Ю.Ю. Аналитическая химия промышленных сточных вод. М.: Издательство «Химия», 1984. 448 с.
7. ПНД Ф 14.1;2.3-95 Количественный химический анализ вод. Методика выполнения измерений массовой концентрации нитрит-ионов в природных и сточных водах. <http://docs.cntd.ru/document/1200056724>.
8. ПНД Ф 14.1;2.4-95 Количественный химический анализ вод. Методика выполнения измерений массовой концентрации нитрат-ионов в природных и сточных водах. <http://docs.cntd.ru/document/1200056725>.
9. Галюк О.С., Рубцов Ю.И., Малиновская Г.Ф. и др. // Журнал физической химии. 1965. Т. 39. С. 2319.
10. Справочник химика 21. Химия и химическая технология. С. 358, 423. <http://chem21.info/info/1001635> (дата обращения 29.03.2017).

STUDY OF BIODEGRADATION OF NITROCELLULOSE USING FUNGUS *FUZARIUM SOLANI*

V. A. Khryachkov¹, E. A. Saratovskikh^{2*}, and R. N. Yarullin³

¹Federal Governmental Research Institute “Geodezia”, Krasnoarmeysk, Moscow region, Russia

²Institute of Problems of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, Chernogolovka,
Moscow region, Russia, *e-mail: easar@icp.ac.ru

³Kazan (Volga region) Federal University, Kazan’, Russia

Received March 30, 2017

Abstract – The results of solving the problem of cleaning up industrial waste waters of nitrocellulose (NC) manufacturing by biodegradation method are presented. The purpose of the study was to select a microorganism or a combination thereof, capable of oxidizing the persistent biopolymer – NC, to the maximum oxidation degree and as quickly as possible. In the present study, NC waste samples with a nitrogen content of 13.38 wt.% were subjected to biological oxidation using a filamentous fungus *Fusarium solani*. The time of incubation of the NC samples with *F. solani* was 5, 16, 38, and 65 days. The maximum decrease in the N content was ca.3%; the maximum concentration of nitrate ions formed in the solution was 11.40 µg/ml; pH values were shifted to the acidic region. The molecular mass of the NC samples reduced significantly: from 324216 (for the initial sample) to 37300. The heat release value decreased to 770 cal/g within 36 days compared to 975 cal/g for the initial sample. The greatest changes were observed after the first 5 and 16 days of incubation, which can be considered a promising result in terms of practical use of the method.

Keywords: nitrocellulose, biological oxidation, *Fusarium solani*, purification of industrial wastewater.