**V Международный конкурс исследовательских работ школьников**

**"Research start" 2022/2023**

**Ферментативная очистка сточных вод от карбамида.**

**Исследовательский проект**

**Экология**

 **ВЫПОЛНИЛ:**

Шаламова Мария Александровна

 МАОУ «Лицей №77, г. Челябинска»,

 8 класс

 **НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ:**

Вахидов Марс Нуриевич

 руководитель Регионального

 ресурсного центр «Химия плюс»

**Челябинск – 2022**

**Ферментативная очистка сточных вод от карбамида**

**Шаламова Мария Александровна**

**МАОУ лицей № 77 (Базовая площадка РАН), г. Челябинск, 8 класс**

**Введение**

Проблема загрязнения окружающей среды отходами сельскохозяйственного и промышленного производства (например, производство мочевиноформальдегидных смол) в настоящее время приобретает глобальный характер и является угрозой для всей биосферы нашей планеты. Одной из таких проблем в последние десятилетия стало избыточное поступление мочевины в естественные водоёмы и в почвенные растворы. Избыточная мочевина поступает в окружающую среду совместно с другими загрязнителями (например катионы тяжёлых металлов), которые ингибируют ферментативные системы микроорганизмов, ответственные за гидролиз карбамида. Избыток мочевины в окружающей среде приводит к деградации водных биоценозов, а также негативно сказывается на почвенной флоре. Избыток мочевины в окружающей среде может приводит к образованию целого ряда токсичных для животных (и человека) растворимых комплексов. В связи с заявленной проблемой разработка систем очистки сточных вод от карбамида является весьма актуальной.

**Цель** нашего исследования – разработка модуля очистки сточных вод от мочевины с превращением её в полезные продукты.

**Рабочая гипотеза** нашего исследования состоит в том, что, применяя материалы биологического происхождения, содержащие фермент уреазу в правильно организованной системе, можно эффективно очистить сточные воды от карбамида, превратив этот загрязнитель в востребованные удобрения (фосфат аммония, поташ).

**Основные методы,** которые мы применяем в своей работе – это , абсорбция (водные растворы кислот и щелочей), адсорбция (и хемосорбция), ферментативный гидролиз, качественный анализ с применением энзимов.

**Задачи:**

1. Анализ литературных источников по проблеме загрязнения окружающей среды карбамидом и по системам ферментативного гидролиза органических веществ;

2. Разработка методики очистки сточных вод, содержащих мочевину, с применением уреазы, приемлемой для промышленных и сельскохозяйственных предприятий;

3. Создание действующей модели модуля очистки воды от мочевины, основанной на применении биокатализа, с использованием доступных и безопасных материалов и оборудования

**Литературный обзор**

Если бы в биосфере отсутствовали процессы гидролиза карбамида, гидросфера Земли очень быстро была бы перенасыщена этим азотистым соединением. Однако в природе (почве, воде и т. п.) присутствуют бактерии и грибы, способные вырабатывать энзим, катализирующий гидролиз поступающей в биоценозы мочевину [1]. Этот фермент, называемый уреазой (систематическое название: уреоамидогидролаза, шифр КФ 3.5.3.1), выполняет грандиозную работу в планетарных масштабах, катализируя реакцию:

CO(NH2)2 + H2O = CO2 + 2 NH3

Эту реакцию можно рассматривать как биохимическую минерализацию органического азотистого соединения. В результате этой химической реакции водорастворимое нелетучее органическое соединение (карбамид) превращается в летучие продукты - аммиак и углекислый газ. Основная масса образовавшихся продуктов не улетучивается, а в нейтральной среде водоёмов и в почве взаимодействует между собой с образованием преимущественно гидрокарбоната аммония. NH4HCO3 усваивается растениями и микроорганизмами (бактерии, грибы, простейшие), и используется как источник азота для биосинтеза протеинов, нуклеиновых кислот, АТФ и других важных азотсодержащих биоорганических соединений [2]. Иначе говоря, в результате, ускоряемой уреазой реакции, биотический поллютант (карбамид) превращается в биологически доступный нутриент (аммонийную соль) автотрофных организмов гидросферы [3].

Исходя из ее биологического (биосферного) значения, уреаза широко распространена в мире микроорганизмов, а также растений (бобовые и некоторые другие). Важно отметить, что уреаза совершено отсутствует в тканях животных [4]. Обнаружение уреазной активности слюны, мочи, лифы, плазмы крови и в других биологических средах однозначно свидетельствует об оккупации организма животного (и человека) патогенными микроорганизмами [5]

Значительная часть аммонийного азота превращается, при участии энзимов почвенных микробов, в соединения с положительными степенями окисления азота (нитраты и др.). Эти соединения особенно легко усваиваются корневой системой растений и используются для биосинтеза собственных азотистых соединений, в том числе растительных белков, которые в свою очередь служат пищей для животных, превращающих растительные протеины в карбамид. Так в природе осуществляется глобальный цикл круговорота азота [6]. Круговорот белкового азота показывает взаимосвязь животных, растений и бактерий, и роль представителей каждой группы организмов. Схема азотного цикла (упрощённая) имеет вид: 1-гидролиз белков животных; 2-гидролиз аргинина и образование мочевины;

3-гидролиз мочевины бактериями; 4-окисление аммиака бактериями; 5-утилизация аммиака и диоксида углерода в растениях – синтез растительных белков; 6-дезаминирование аминокислот [7].

Уреаза широко распространена в мире микроорганизмов, причем уреазную активность можно обнаружить как у сапрофитов, так и у патогенных микробов. В частности, высокая активность уреазы у родов Proteus, Staphylococcus.

Несмотря на то, что уреаза была обнаружена и выделена (именно из растительного материала) в кристаллическом виде (классические работы Сомнера), ее функция у растений организмов до сих пор остается невыясненной [8].

То, что ткани животных не содержат уреазу, является важным благом. В противном случае это привело бы к образованию повышенных количеств аммиака и к аммиачному токсикозу в тканях, а после к скорой гибели. Однако это совершенно не означает, что в организме высших животных (и человека) не осуществляется ферментативный гидролиз карбамида. Этот процесс протекает в тех компартаментах организма, которые колонизированы микробами (бактерии и грибы): желудочно-кишечный тракт, (в частности толстый кишечник), ротовая полость, кожные покровы. Высокая уреазная активность биологических сред организма животных (и человека) явный симптом инфекционного заболевания [9]. Например, появление уреазной активности в свежей моче свидетельствует об инфицировании мочеполового тракта [9].

В последние годы однозначно доказана роль (нобелевская премия) уреазопозитивных геликобактерий (Helicobacter pylori) в патогенезе язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки, а также разработаны на этой основе биохимические тесты для диагностики этих болезней. Однозначно доказана важная роль уреазы в так называемом, рубцовом пищеварении у жвачных животных. У таких животных возможна частичная замена ценного кормового белка на дешевый карбамид,

В настоящее время в гидросферных экологических системах уреазная активность микроорганизмов природных вод хотя и обнаруживается, но находится на относительно низком уровне, что опасно для биогеоценозов и биосферы в целом [10]. Учёные-экологи объясняют этот феномен тремя основными причинам:

1. Невысокой концентрацией уреазно - позитивных микроорганизмов в естественных водоемах;

2. Низкой фоновой концентрацией субстрата (карбамида);

3. Ингибированание микробной уреазы ионами тяжелых металлов и рядом органических загрязнителей.

Поэтому в образцах исследуемой природной воды всегда обнаруживается некоторое количество неразложившегося карбамида («фоновой» мочевины). Уровень мочевины в обследованных водоемах обычно варьирует от 3,30 мкмоль/л до 10,26 мкмоль/л. Отмечены незначительные сезонные колебания уровня карбамида в природных водах. Возникает необходимость в создании систем очистки сточных вод от мочевины. Традиционно для очистки воды применяются биологические и химические методы очистки воды от карбамида. Биологические методы основаны на использовании флоры планктона и бентоса. Недостатки метода связаны с развитием сопутствующей флоры, которая способна уничтожать уреазно-активых микробов, возможностью образования некотрых вредных веществ (требуется дополнительные стадии очистки), развитием процессов гниения [11,12]. Химические методы очистки воды от мочевины основаны на окислении или гидролизе мочевины [12,13]. В этих методах, как правило, используются опасные вещества (сильные окислители, щёлочи), что приводит к необходимости использования сложного оборудования и создания особых мер защиты работников на предприятиях очистки воды. Ещё одна особенность химических методов очистки, которые применяются в настоящее время, состоит в том, что мочевина превращается в продукты, которые не находят практического применения. Существуют также электрохимические методы очистки воды. Эти методы имеют существенный недостаток – большие затраты электроэнергии и сложность оборудование. Перечисленные методы химической (и электрохимической) очистки сточных вод требует больших затрат на оборудование, реактивы, энергию и не исключает образования нежелательных побочных веществ.

**Исследования, содержащих уреазу, биологических материалов**

Приступая к решению задачи по разработке методики ферментативного гидролиза, мы должны были определиться с биологическим материалом, содержащим фермент уреазу.

Очевидно, что наиболее перспективным нам представлялось для очистки сточных вод от мочевины применить бактериальную флору, содержащую. Уреаза широко распространена в мире микроорганизмов Высокую уреазную активность можно обнаружить как у сапрофитов, так и у ряда патогенных бактерий, грибов (уреазная активность отмечена у некоторых простейших). В частности, высокая активность уреазы отмечается у родов Proteus, Staphycococcus, Gallinae и др. Многие сапрофиты, обладающие высокой уреазной активностью, встречаются в почве и в пресных водоёмах. Важным преимуществом применения бактерий для очистки воды от мочевины является их способность к размножению.

Нами (по рекомендации учёных Челябинского медицинского университета) были взяты образцы воды из участков оз. Смолено (прибрежная зона). Далее в эту воду мы добавляли соединения, содержащие важные для бактерий, микроэлементы (калий, фосфор, железо, марганец, цинк и др.) и субстрат – карбамид. Спустя 5 дней в ферментере над на высоте 7-10 см над поверхностью раствора мы подвешивали увлажненную универсальную индикаторную бумагу. Спустя 10-15 минут универсальная индикаторная бумага окрашивалась в синий цвет. Развитие синей окраски обусловлено тем, что в процессе ферментативного гидролиза мочевины образовывался аммиак, который создавал щелочную среду на поверхности индикаторной бумаги. Опыт мы повторяли несколько раз (в тении недели) с одним и тем же раствором, поддерживая концентрацию мочевины равной 4 %. Время развития синей окраски индикатора к концу недели уменьшилось до 5-6 минут. Это свидетельствует о том, что активность бактерий возрастала. Хотя часть мочевины они употребляли для своих нужд, выход аммиака заметно возрастал.

Однако применение бактерий, обладающих уреазной активностью, для биологической очистки воды мы считаем нецелесообразным. Наблюдение за процессами ферментере (изменение цвета, запахи, появление плесневых организмов) позволяет утверждать, что наряду с ферментативным гидролизом карбамида, протекают процессы брожения и гниения, гибель одних бактерий и развитие нежелательной флоры, продуцирующей трупные яды (кадаверин и др. токсины), а также триптамин и другие алкалоиды. Таким образом, решая задачу очистки воды от мочевины мы пришли к тому, что загрязняли её куда более опасными веществами. Можно ли применять бактерии обладающие уреазной активностью для очистки воды от карбамида? Да можно. Но для этого важно использовать селективные антисептики, исключающие возможность развития в ферментере нежелательной флоры. Поиск таких антисептиков (не дорогих, надёжных и безопасных для человека и окружающей среды) – одно из перспективных направлений нашей дальнейшей работы.

На следующем этапе нашего исследования мы изучали растительные организмы, богатые уреазой. Этим энзимом весьма богаты некоторые растения. Примером таких растений являются: соя, конский боб, арбуз. В семенах (а также в ботве) этих организмов весьма высокая уреазная активность. Наши опыты (оценивали скорость гидролиза мочевины) показали, что наиболее высокая уреазная активность отмечается у сои. Однако уреазная активность сои заметно уступала такой активности у бактерий. Мы предположили, что уреазная активность может оказаться более высокой у генетически модифицированной сои. Для эксперимента мы использовали муку ГМО-сои и муку (генетически не модифицированную) в качестве контроля. В ёмкости (химический стакан, объёмом 150 мл.) помещали по 1 грамму соевой муки и по 10 мл. 4 % раствора мочевины. Над раствором (4 см от поверхности раствора) подвешивали универсальную индикаторную бумагу (предварительно смоченную водой). Стаканы закрывали (не плотно) крышкой. Опыт проводили в помещении с температурой 150 С. В ёмкости с генетически модифицированной соей универсальная индикаторная бумага окрашивалась в синий цвет через 5-6 минут. В контроле (соя без генетической модификации) универсальная индикаторная бумага окрашивалась в синий цвет только спустя 16-18 минут. Эти опыты мы повторяли многократно (30 раз). Результаты повторялись каждый раз. Можно утверждать, что наше предположение о более высокой уреазной активностью (примерно в три раза больше) генетически модифицированной сои оказалось верным.

Особенностью применения растительных материалов для решения задач очистки воды от мочевины мы считаем легкая отделимость растительного материала от очищаемой воды, возможность дальнейшего использование растительного материала (компост) и его способность к адсорбции некоторых катионов тяжёлых металлов, таких как медь, свинец, кадмий и др. (применение для решения других экологических задач).

Для создания модуля очистки сточных вод от мочевины (действующая модель) мы применили ботву генетически модифицированной сои. Было установлено, что высокая уреазная активность этого растительного материала сохраняется в широком температурном диапазоне (от + 3 до + 42 градусов Цельсия). По способности ускорять реакцию гидролиза карбамида уреазу можно отнести к суперэффективным биологическим катализаторам. Уреаза снижает энергию активации реакции со 137 кДж/моль до 46 кДж/моль. Расчёт по уравнению Аррениуса ( ln k1/k2 = - ( Ea2 – Ea1 ) / RT) показывает, что такое снижение энергии активности (при температуре 50 С) соответствует ускорению в 1,256 \* 1017 раз. Такая высокая уреазная активность свидетельствует о исключительно важном значении для биосферы превращения мочевины в аммиак и в углекислый газ при участии фермента.

**Система ферментативной очистки воды от мочевины**

**(действующая модель)**

Система очистки воды от мочевины представляет собой несколько соединённых последовательно ёмкостей. Первая ёмкость представляет из себя сосуд с встроенной в верхней части ультрафиолетовой лампой. Жесткий ультрафиолет необходим для дезинфекции воды и коагуляции белков. Этот элемент системы необходим для того, чтобы исключить нежелательную микробную активность в основной ёмкости (ферментере), такую, как гниение, брожение и т.д.

Следующая ёмкость представляет собой фильтр грубой очистки. В этой ёмкости задерживаются крупные части, в том числи погибшие от ультрафиолета микробы. В качестве материала фильтра мы применили силикатную вату. У данной ёмкости предусмотрена возможность промывки и замены наполнителя фильтра.

В процессе разработки методики ферментативной очистки воды от мочевины, мы столкнулись с проблемой снижения активности уреазы из-за её ингибирования ионами тяжелых металлов, которые могут находиться в сточной воде. Для предотвращения негативного влияния ионов тяжёлых металлов на ферментативною активность уреазы, мы включили в систему очистки воды третью ёмкость, наполнителем в которой служит, изготовленный нами катионит, с повышенной адсорбционной ёмкостью.

Обычно в качестве катионитов применяют полимеры (или олигомеры) с доступными для взаимодействия (с ионами в растворе) функциональными группами. Широкое распространение получили полимеры-катиониты, содержащие сульфогруппы и карбоксильные группы.

Для получения необходимого нам катионита мы использовали в качестве исходного вещества пара-оксибензойную кислоту. Это вещество может вступать в реакцию окислительной конденсации с образованием больших молекул-полимеров с доступными для взаимодействия с катионами металлов карбоксильными группами. Применение чисто химических методов получения таких катионитов предусматривает применение окислителей, которые сами по себе не безопасны и не менее опасны образующиеся из них продукты. То есть требуется создавать определенные безопасные условия хранения таких реактивов и решать задачи утилизации продуктов из них образующихся. Поэтому мы приняли решение получить необходимый катионит на основе применения биологических катализаторов, относящихся к классу оксидоредуктаз. Первые (удачные) опыты мы проводили с применением пероксидазы (источник – капуста белокочанная). Окислительную конденсацию проводили с применением 2 % раствора пероксида водорода. В результате реакции образовался тёмно-бурый осадок. Далее восстанавливали кето-группы структурных звеньев олигомера до гидроксо-групп с помощью сульфида калия, с последующим добавлением гидрокарбоната калия (нейтрализовали карбоксильные и гидрокси-группы катионита). Олигомер приобретал светло-коричневый цвет (вследствие восстановления кето-групп). Появление доступных гидроксильных групп (с замещённым на ионы калия водородом) в структурных звеньях олигомера повышала способность катионита с хемосорбции (гидроксильные группы также могут связывать катионы тяжёлых металлов). Полученный катионит далее мы исследовали на предмет способности к хемосорбции таких катионов тяжёлых металлов, как катионы свинца, кадмия, ртути. Для исследования мы брали образцы воды, содержащий до 1 % хорошо растворимых солей этих тяжёлых металлов. Результат оказался вполне хорошим. Полученный нами олигомер-катионит массой 10 грамм при обычных (стандартных) условиях способен адсорбировать почти всю медь из 95, 4 мл 1% раствора сульфата меди (II), что в 1,28 больше, чем при использовании, полученного химическим путём катионита КУ-2 у в К-форме.

Однако применение данной методики в промышленных масштабах (по нашим оценкам) оказывается не рентабельным. Причина в относительной дороговизне пероксида водорода. Было принято решение применить для решения задачи синтеза катионита применить другой биологический катализатор – оксидазу растительного происхождения (ботва культурных растений). После серии опытов с растительным сырьём мы остановились на применении ботвы розоцветных, весьма богатых необходимыми нам ферментами. Растительное сырьё помещали в ёмкость с 5% раствором пара-окси-бензойной кислоты. Далее в течении 5 часов пропускали, через эту ёмкость, предварительно очищенный воздух. Наблюдали образование знакомого нам по предыдущим опытам с пероксидазой бурого осадка. Осадок отделяли от растительного материала и исследовали на предмет адсорбции катионов тяжёлых металлов как это мы делали с катионитом, полученным на основе методики с применением пероксидазы. Результаты оказались даже несколько лучше. Полученный нами олигомер-катионит массой 10 грамм при обычных (стандартных) условиях способен адсорбировать почти всю медь из 95, 4 мл 1% раствора сульфата меди (II), что в 1,41 больше, чем при использовании, полученного химическим путём катионита КУ-2 у в К-форме. Объяснить это можно тем, что пероксид водорода мог участвовать в деструктивных для катионита процессах, снижая в итоге его сорбционную способность. Несомненно, использование воздуха как источника окислителя (кислород) и попутная очистка воздуха от токсичных веществ, микробов – экологически целесообразное и экономически более выгодное решение.

Следующая (главная) ёмкость в нашей системе очистки воды от мочевины – ферментер. В нём протекает реакция гидролиза мочевины с образованием аммиака и углекислого газа. Продукты гидролиза (газы) поступают в следующую ёмкость. В ней находиться 10% раствор орто-фосфорной кислоты. В этой ёмкости аммиак превращается в фосфат аммония по схеме:

 3 NH3 + H3PO4 = (NH4)3PO4

В следующей ёмкости находится 10% раствор щёлочи, с которым реагирует углекислый газ:

 2 КОН + СО2 = К2СО3 + Н2О

Таким образом, решая задачу очистки воды от мочевины, мы получаем два полезных продукта. Фосфат аммония – ценное азотное и фосфорное удобрение. Карбонат калия – также ценное калийное удобрение, которое также может применяться для раскисления почв и прикорневой подкормки сельскохозяйственный культур углекислым газом.

Очищенная от мочевины, и ионов тяжелых металлов вода, может далее использоваться в различных технологических процессах, включая сельскохозяйственное производство.

**Выводы:**

1. Были исследованы различные биологические источники фермента уреазы, которые можно применить для решения задач очистки сточных вод от карбамида. Опытным путём было установлено, что наиболее эффективным для решения задач является ботва ГМО-сои, обладающая высокой уреазной активностью и способностью сорбировать сопутствующие загрязнители воды.

2. Предлагаемая нами методика очистки воды от карбамида основана на использовании простых, доступных и безопасных материалов и оборудования. Процесс очистки воды осуществляется при обычных температурах и давление, характеризуется высокой скоростью и не приводит к образованию побочных продуктов (ферменты работают быстро и точно).

3. Разработана методика синтеза катионита на основе пара-оксибензойной кислоты на основе применения биокатализатора – оксидазы розоцветных. Данный катионит необходим в системе очистки воды для хемосорбции ионов некоторых металлов, способных ингибировать уреазу (защита уреазы).

4. Создан действующий модуль очистки сточных вод от мочевины, с превращением её в полезные продукты, а именно в фосфат аммония и поташ (ценные удобрения).

5. Разработанная нами система может находить применение на учебных занятиях с учащимися школ и со студентами ВУЗов для развития естественнонаучной грамотности, формированию конвергентного подхода к решению проектных задач.

**Литература:**

1. V. Jenks, Catalysis in chemistry and Enzymology. M.: Nauka, 1963. P. 45-73.

2. Sumner J. B. Chemistry of enzymes and methods of their research. M.: Chemistry, 1948.With. 78-109.

1. Р. Реннеберг. Эликсиры жизни. М.: Мир, 1987.-334 с.

2. Р. Доссон Д. Эллиот и другие «Справочник биохимика» Москва.: Мир, 1991.- 428 с.

3. А. Сассон. Биотехнология содержания и надежды. М.: Мир, 1987. – 324 с.

4. Галактионов С.Г. Биологически активные вещества – URL: https://www.litmir.me/br/?b=190544&p=1

5. Гарин В.М. Промышленная экология: учеб.пособие. /В.М.Гприн, И.А.Кленова, В.И.Колесников - М.: Маршрут, 2018.- 328 с.

6. Голдовская Л.Ф. Химия окружающей среды : учебник для студентов высших учебных заведений/ Л.Ф. Голдовская. - 2-е изд. - Москва : Мир : БИНОМ. Лаб. знаний, 2017 (Вологда : Полиграфист). - 294, [1] с

7. В.Н. Сойфер. Молекулы живых клеток. М.: Знание, 1995.- 189 с.

8. Касьян А.А. Современные проблемы экологии./А.А. Касьян - М.: Просвещение, 2011.-2024 c

9. Медицинская экология. Стожаров А.Н\_Уч пос\_Минск Беларусь 2017 -368с.

10. Макаров К. А. Химия и здоровье / К. А. Макаров. - М. : Просвещение, 1995. - 144 с.

11. Николаев Л.А. Химия жизни [Текст] / Л. А. Николаев. - Москва : Просвещение, 1997. - 239 с

12. Нейфан А. А. Клеточные и генетические основы биотехнологий. М.: Знание, 1997. - 302 с.

13. Филлипович Ю.Б. и др. Практикум по общей биохимии. М.: Просвещение, 2012.–302 с.

14. Кузнецов В.П. Всемогущие ферменты. - М.: Знание, 2006.

15. Хазиев Ф.Х. Почвенные ферменты. - М.: Знание, 1992.

16. Мишунин И.Ф., Шевченко М.И. Этюды и биотехнологии. - Киев.: Наукова Думка, 1995.