

УДК 61.614.8

**МИНИМИЗАЦИЯ РИСКОВ ТОКСИЧЕСКОГО ОТРАВЛЕНИЯ  
ПЕРСОНАЛА ПУТЕМ АВТОМАТИЗАЦИИ ПРОЦЕССА  
ФЕРМЕНТАЦИИ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ  
НЕФТЕОКИСЛЯЮЩИХ БАКТЕРИЙ**

**MINIMIZING THE RISKS OF TOXIC PERSONNEL APPLICATION  
BY AUTOMATION OF THE FERMENTATION PROCESS  
FOR OBTAINING OIL-OXIDIZING BACTERIA**

**Савичева Ю.Н., Закирова З.А., Валиева А.В., Абдуллина Д.Р.**

**Уфимский государственный нефтяной технический университет,  
г. Уфа, Российская Федерация**

**Y.N. Savicheva, Z.A. Zakirova, A.V. Valieva, D.R. Abdullina**

**Ufa State Petroleum Technological University,  
Ufa, Russian Federation**

**e-mail: waliewa.aliya2011@yandex.ru**

**Аннотация.** На сегодняшний момент проблема защиты персонала при производстве препаратов на основе нефтеокисляющих бактерий, служащие основой биологического метода очистки почвы и воды после разливов нефти и нефтепродуктов, является одной из острых проблем. Основное оборудование, применяемое при производстве микроорганизмов деструкторов нефти, является ферментер. По своей сути процесс ферментации относят к критическому, в связи к особым требованиям стерильности ведения производства.

В данной статье выделены основные этапы процесса ферментации для производства микроорганизмов деструкторов нефти и нефтепродуктов, а также отдельно описаны риски возможные при ведении производства.

Выявлены потенциально опасные участки, где производственный персонал будет подвержен негативному влиянию производственной среды. Рассмотрены потенциальные участки узлов ферментера, где персонал непосредственно взаимодействует с активной микрофлорой, а также подробно рассмотрены компоненты моющих средств: как одиночных, так и их комплексное взаимодействие и отмечены недостатки средств используемых на производстве сегодня, и их влияние на организм человека. Предложен метод модернизации моющих веществ для снижения рисков отравления персонала, а также уменьшения возможной адаптации бактерий.

Для уменьшения рисков заражения предложены методики по модернизации традиционных методов при эксплуатации ферментера. Автоматизация узлов аппарата позволит на многих этапах работы избежать контакта производственного персонала с бактериями и реактивами, а также уменьшит человеческий фактор при ведении производства, тем самым увеличивая производительность препарата, путем сохранения оптимальных условий для роста и развития нефтеокисляющих бактерий.

**Abstract.** To date, the problem of protecting personnel in the production of drugs based on oil-oxidizing bacteria, which serve as the basis for the biological method of cleaning soil and water after oil and oil spills, is one of the acute problems. The main equipment used in the production of microorganisms of oil destructors is a fermenter. In essence, the process of fermentation is considered critical, in connection with the special requirements of sterility of production.

In this article, the main stages of the fermentation process for the production of microorganisms of oil and petroleum product destructors are singled out, and also the risks that are possible when conducting production are separately described. Potentially dangerous areas have been identified, where production personnel will be exposed to the negative impact of the production environment. Potential sites of the fermenter assemblies are considered, where the personnel

interact directly with the active microflora, as well as the components of detergents, both single and their complex interaction, are noted in detail and the shortcomings of the means used in production today and their effect on the human body are noted. A method for the modernization of detergents has been proposed to reduce the risks of personnel poisoning, as well as to reduce the possible adaptation of bacteria.

To reduce the risks of infection, methods for modernizing traditional methods in the operation of the fermenter are proposed. Automation of the units of the device will allow avoiding the contact of production personnel with bacteria and reagents at many stages of work, and also reduce the human factor in conducting production, thereby increasing the productivity of the preparation, by maintaining optimal conditions for the growth and development of oil-oxidizing bacteria.

**Ключевые слова:** отравление, производственный персонал, управление рисками, ферментация, автоматизация, поверхностно-активные вещества, перекись водорода, нефтеокисляющие бактерии, аэробный процесс.

**Key words:** poisoning, production personnel, risk management, fermentation, automation, surface-active substances, hydrogen peroxide, oil-oxidizing bacteria, aerobic process.

При производстве препаратов на основе нефтеокисляющих бактерий для очистки почв и водоемов от нефти и нефтепродуктов производственный персонал подвержен многим факторам риска: производственным и биологическим, так как работа связана с использованием активной микрофлоры. Основным оборудованием, в котором проходит биосинтез препарата, является ферментер.

Работу с ферментером приравнивается к критическому процессу, так как его эксплуатация связана с большим количеством рисков токсического

воздействия на персонал. Это связано с постоянным взаимодействием работников с живой микрофлорой. Необходимо, в первую очередь, защитить нефтеокисляющие бактерии и микроорганизмы от посторонней микрофлоры, что требует от рабочего персонала полной стерильности при работе на производстве, а также абсолютной точности при отборе проб. Также необходимо четко придерживаться заданных условий ферментации, так как любое отклонение приводит к тому, что процесс необходимо начинать заново, и, как следствие, приводит нежелательному повторному взаимодействию работника с живой микрофлорой и химическими реактивами, а также к большим потерям целевого продукта.

Применяя систему управления рисками совместно с системой менеджмента качества и учитывая современные требования к биотехнологическому оборудованию, описанные в cGMP (current Good Manufacturing Practice) [1, 2], предложены методы по минимизации рисков при эксплуатации ферментеров и повышения условий труда.

Процесс ферментации, необходим для роста и развития нефтеокисляющих бактерий, составляющий основу биологического метода очистки почв и водоемов. В независимости от вида микроорганизмов, участвующих в процессе очистки, главной целью является наибольший выход продукта. Для этого рабочему персоналу необходимо постоянно поддерживать оптимальные условия среды для роста и развития бактерий. И, как следствие, работа в этой области связана с эмоциональной нагрузкой, связанной с необходимостью поддержания высокой степени напряженности мозга и анализаторных систем и требований 100 % точности.

Как отмечалось ранее, эксплуатация ферментера относится к критическому процессу. Заражение культуры микроорганизмов посторонней микрофлорой является одним из «затратных» рисков, так как нарушается весь процесс биосинтеза с полной потерей компонентов среды. При этом засев ферментера необходимо проводить заново, что включает в

себя чистку оборудования, асептирование воздуха и самого аппарата, пересев культуры микроорганизмов из колб или чашек Петри в производственный аппарат, производимый непосредственно производственным персоналом.

Заражение культуры посторонней микрофлорой возможно на стадии мойки ферментера. На этой стадии аппарат практически вручную очищают от остатков культуры и продуктов биосинтеза прошлой операции, ее проводят перед стерилизацией для уменьшения нагрузки на стерилизатор. В качестве моющего средства предпочтительно использовать растворы поверхностно-активных веществ (ПАВ). Для уменьшения воздействия на производственный персонал, предложена замена традиционных видов моющих средств. На сегодняшний момент используются различные препараты в основе, которых лежат различные спирты, альдегиды, кислоты, щелочи, галогенсодержащие и аммониевые соединения [3]. Самостоятельно могут применяться также алкилдиметилбензиламмонийхлорид и цетилпиридинийхлорид в качестве моющих средств. Из-за постоянной адаптации микроорганизмов, требуется постоянная замена или модернизация ПАВ [4]. Однако главным недостатком является именно кумуляция бактерий, что наносит наибольший вред на производственный персонал. Всем требованиям, заявленным к процессу, близко использование пероксида водорода. Однако для полного удаления остатков живой микрофлоры требуется использование высоких концентраций растворов, что может привести к отравлению производственного персонала. Перекись водорода – сильный окислитель, может вызвать раздражение и ожоги при попадании на кожу, слизистые оболочки и дыхательные пути, при концентрации раствора более 30 % может привести к летальному исходу (в бытовых условиях используется концентрация пероксида 3 %, в промышленности – от 6 %). Следует отметить, что при более высоких концентрациях этого вещества, оно обретает взрывоопасные свойства, это связано с его разложением и

большим выходом атомов кислорода [5]. Предложено на данном этапе предварительно обрабатывать аппарат раствором двухвалентного железа (концентрация варьируется от 5 мМ до 15 мМ), и далее использовать раствор пероксида водорода (концентрация – 20 мМ-50 мМ). Данный способ имеет ряд преимуществ, он применим в большом диапазоне действия, охватывая множество бактерий, значительно сокращается время обработки аппарата, и все это при использовании низких концентраций рабочих веществ, что сокращает вредное воздействие на производственный персонал. Такой эффект достигается за счет генерации гидроксильных радикалов при совместной работе ионов соли железа и пероксида водорода [6,7]. При обработке культур *Bacillus subtilis* и *Staphylococcus aureus*, которые являются одними из компонентов консорциума нефтеокисляющих бактерий, выявлено полное уничтожение бактерий (5 мМ раствор FeSO<sub>4</sub> и 20 мМ раствор пероксида водорода). Данные исследований по работе представлены в таблицах 1 и 2 [8].

Таблица 1. Выживаемость культуры *Bacillus subtilis* в зависимости от концентраций FeSO<sub>4</sub> и пероксида водорода

Концентрация H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , мМ	концентрация FeSO <sub>4</sub> , мМ									
	0 мМ		1 мМ		5 мМ		10 мМ		15 мМ	
	КОЕ	% от контроля	КОЕ	% от контроля	КОЕ	% от контроля	КОЕ	% от контроля	КОЕ	% от контроля
0	1794	100	1794	100	1794	100	1702	100	1680	100
5	1710	95,3	1630	90,9	569	31,7	68	4	22	1,3
10	1680	93,6	1486	82,8	218	12,2	37	2,2	14	0,8
15	1452	80,9	1102	61,4	87	3,7	24	1,4	4	0,2
20	1160	64,7	718	40,0	0	0	0	0	0	0
25	760	42,4	334	18,6	0	0	0	0	0	0
30	470	26,2	234	13,0	0	0	0	0	0	0
35	270	15,1	135	7,5	0	0	0	0	0	0
40	150	8,4	68	3,8	0	0	0	0	0	0
50	90	5	39	2,2	0	0	0	0	0	0
60	8	0,4	0	0,0	0	0	0	0	0	0

Таблица 2. Выживаемость культуры *Staphylococcus aureus* в зависимости от концентраций  $\text{FeSO}_4$  и пероксида водорода

Концентрация $\text{H}_2\text{O}_2$ , мМ	концентрация $\text{FeSO}_4$ , мМ									
	0 мМ		1 мМ		5 мМ		10 мМ		15 мМ	
	КОЕ	% от контроля	КОЕ	% от контроля	КОЕ	% от контроля	КОЕ	% от контроля	КОЕ	% от контроля
0	2525	100	2525	100	2525	100	2525	100	2518	100
5	2434	96,4	1800	71,3	56	2,2	44	1,7	35	1,4
10	2410	95,5	1630	64,6	35	1,4	27	1,1	12	0,5
15	2390	95	1120	44,4	14	0,6	0	0	0	0
20	2352	93,2	837	33,1	0	0	0	0	0	0
25	2295	90,8	496	19,6	0	0	0	0	0	0
30	2246	88,9	158	6,3	0	0	0	0	0	0
35	2180	86,3	68	2,7	0	0	0	0	0	0
40	2172	86	35	1,4	0	0	0	0	0	0
50	2148	85,1	0	0	0	0	0	0	0	0
60	2124	84,1	0	0	0	0	0	0	0	0
70	2028	80,3	0	0	0	0	0	0	0	0
80	1932	76,5	0	0	0	0	0	0	0	0
90	1836	72,7	0	0	0	0	0	0	0	0
100	1548	61,3	0	0	0	0	0	0	0	0
150	1260	49,9	0	0	0	0	0	0	0	0
200	972	38,5	0	0	0	0	0	0	0	0
250	684	27,1	0	0	0	0	0	0	0	0
300	514	20,4	0	0	0	0	0	0	0	0
350	432	17,1	0	0	0	0	0	0	0	0
400	407	16,1	0	0	0	0	0	0	0	0
450	382	15,1	0	0	0	0	0	0	0	0
500	357	14,1	0	0	0	0	0	0	0	0
550	332	13,1	0	0	0	0	0	0	0	0
600	307	12,2	0	0	0	0	0	0	0	0

Традиционный метод очистки аппарата довольно долгий процесс и может занять весь рабочий день. В первую очередь, хотелось бы отметить, что процесс мойки энергоемок и при больших объемах производства могут возникнуть ряд проблем, таких как большой расход воды, воздуха, а также моющих средств. Производственный персонал непосредственно взаимодействует с растворами моющих средств, что повышает риск заражения. Также в качестве проблем возникающих на стадии мойки аппарата можно отметить действие человеческого фактора на данном этапе работы.

Предложено использовать контролируемый процесс мойки СІР (от англ. Cleaning in Place). Эта система разработана для увеличения качества очистки технологического аппарата и соответствует требованиям системы сGMP. Процесс мойки автоматизирован, что уменьшает трудозатраты персонала и уменьшает риски биологического заражения. Система, включающая в себя шаровую головку с большим количеством форсунок, устанавливается на крышке аппарата при помощи системы мягких трубок. Подача ПАВ осуществляется с применением дозирующих насосов, которые регулируют количество подаваемого раствора.

Раствор подается под давлением на вращающуюся головку и осуществляет круговое движение по всей поверхности аппарата. За счет давления, достигается высокая скорость подачи ПАВ в ферментер. В некоторых модернизированных системах моющих раствор кипят при работающей мешалке. После необходимо смыть моющий раствор со стенок аппарата, для этого предпочтительно использовать дистиллированную воду. Процесс ополаскивания водой проводится аналогично. В данной операции необходимо постоянно контролировать электропроводность воды, совершающей движение в ферментера. При достижении определенного уровня, систему мойки необходимо остановить.

Следующей операцией является стерилизация ферментера. На этой стадии необходимо привести к необходимому уровню асептики аппарата. Стерильность осуществляется при определенной температуре и времени, которые контролируются операторами. Также необходимо отметить, что при стерилизации необходимо, чтобы питательная среда сохранила свои свойства. При значительном перегреве компоненты среды, необходимые для роста и развития бактерий могут разрушаться, тем самым тормозя производство в целом. Основной фактор, от которого зависит стадия, это человеческий фактор. На практике чаще всего отсутствие стерильности и перегрева среды связано с неосторожностью или ошибками оператора.

Необходимо перейти от работы оператора к специалистам ГИП, максимально автоматизировав процесс, тем самым усовершенствовав систему регулирования процессом [9, 10]. Предлагается использовать для дозировки пара в рубашку специальный паровой клапан, который непосредственно будет поддерживать оптимальные условия ферментации. Тем самым время стерилизации сокращается с 24 до 2 часов.

Одним из методов мониторинга и управление рисками является периодическая проверка и ревалидация действующего оборудования.

Процесс стерилизации предполагает подачу острого пара под давлением, поэтому необходимо, чтобы аппарат обладал гидрофобными свойствами, тем самым мог выдерживать частую периодическую стерилизацию. Большое внимание уделяют отдельным участкам аппарата, где необходим усиленный контроль за процессом. Этими участками являются уплотнения в валу мешалки, фильтры входящего и выходящего воздуха (процесс получения нефтеокисляющих бактерий является аэробным процессом), вентили нижнего спуска из ферментера, устройство для засева ферментера из инокулятора и реакторов для приготовления питательных сред. А также необходимо отметить ряд устройств подводящих к ферментеру: устройства для внесения химического пеногасителя, корректоров параметров технологического процесса и устройства для отбора проб. Снижения рисков заражения можно обеспечить путем закрытых и изолированных обвязок, это полностью исключит контакт рабочей среды с внешней, изоляция устройств позволит, не прерывая процесс ферментации, проводить операцию стерилизации.

Биотехнологическое производство представляет собой непрерывный процесс, что требует постоянного контроля, для того чтобы постоянно поддерживать максимальный выход продукта. Человек не всегда успевает вовремя реагировать на изменения в процессе биосинтеза и поддерживать оптимальные условия для роста микроорганизмов. Как отмечалось ранее, в ходе ферментации возможен перегрев культуры, что снизит или пагубно

повлияет на скорость развития бактерий. Нефтеокисляющие бактерии, как подгруппа аэробных бактерий, в процессе жизни и развития выделяют большое количество тепла, это напрямую связано с количеством потребляемого ими кислорода. В связи с этим идет повышение температуры внутри аппарата, вследствие чего необходимо постоянное отведение тепла за счет подачи в рубашку ферментера воды. Эффективность охлаждения зависит от разности температур внутри аппарата и в рубашке ферментера, размеров самого аппарата, а также толщины и материала из которого сделан ферментер. Так как на данный момент в промышленных масштабах применяются ферментеры из нержавеющей стали, то перегрев питательной среды происходит довольно часто. Для уменьшения этого фактора можно использовать внешние пластинчатые теплообменники. Такой вид теплообменника значительно сокращает время охлаждения ферментера за счет наиболее эффективного отвода тепла, так как он реагирует даже на незначительную разницу температур между охлаждаемой питательной средой и охлаждающей водой.

## **Выводы**

Как говорилось ранее, нефтеокисляющие бактерии являются анаэробными, поэтому с увеличением количества клеток необходимо повышать количество подаваемого кислорода в среду. Необходимо постоянно контролировать скорость потребления кислорода микроорганизмами. Основной элемент, обеспечивающий интенсивный массоперенос воздуха в культуральной жидкости является мешалка, позволяющая увеличить скорость перемешивания, а также установленные на внутренних стенках ферментера пластины необходимые для увеличения интенсивности процесса. Следует отметить устройства, обеспечивающие большую эффективность аэрации, при их применении происходит образование большого количества маленьких пузырьков, а также

увеличивается расход подаваемого воздуха в ферментер. Необходимо автоматизировать систему поддержания оптимальной концентрации растворенного кислорода, для этого могут использоваться дополнительные устройства. Применима система управления концентрацией растворенного кислорода, который регулирует скорость вращения мешалки и количество подаваемого в аппарат воздуха, процесс контролируется при помощи специальных датчиков.

### Список используемых источников

1 Руководство для промышленности. Стерильные лекарственные препараты, производимые методом асептической обработки // Действующая надлежащая практика производства, FDA США, сент. 2004 г.

2 Руководство для промышленности. Качественный подход к фармацевтическим нормам // US FDA, сент. 2004 г.

3 Шварц А. Поверхностно-активные вещества и моющие средства. М.: изд - во. Иностранной литературы, 1960. С.152.

4 Соколова Н.Ф. Методологические основы определения устойчивости микроорганизмов к дезинфицирующим средствам // Материалы VIII съезда Всероссийского общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов. 2002. 4. С.55-56.

5 Красильников А.П. Справочник по антисептике. Мн.: Выш. шк. 1995. 367 с.

6 Раян Т.Р., Ауст С.Д. Роль железа в кислородно-опосредованной токсичности // Токсикология. 1992. №.22. С.119-141

7 Алам М.З., Огаки С. Роль перекиси водорода и гидроксильного радикала при выделении остаточного эффекта ультрафиолетового излучения // Водная среда. 2002. №.74. С.248-255

8 Способ дезинфекции объектов окружающей среды / О.В. Бухарин, А.В. Сгибнев, С.В. Черкасов: пат. 2321426, Рос. Федерация. № 2006128009/15; заявл. 01.08.2006; опубл. 10.04.2008, Бюл. № 33.

9 Современные технологии для проведения производственного контроля, повышающие уровень промышленной безопасности на объектах нефтегазовой отрасли / Р.А. Кускильдин, Н.Х. Абдрахманов, З.А. Закирова, Э.Ф. Ялалова, К.Н. Абдрахманова, В.В. Ворохобко // Проблемы сбора, подготовки и транспорта нефти и нефтепродуктов, 2017. № 2 (108). С. 111-120.

10 Системы оценки риска возникновения аварийных ситуаций на объектах нефтегазовой отрасли / Н.Х. Абдрахманов, З.А. Закирова, Г.Ф. Заляева, Р.А. Кускильдин // Нефтегазовое дело. 2017. Т. 15. № 1. С. 226-230.

### References

1 Guidance for Industry. Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing-Current Good Manufacturing Practice // US FDA, September 2004.

2 Guidance for Industry. Quality Systems Approach to Pharmaceutical Current Good manufacturing Practice Regulations // US FDA, September, 2004.

3 Shvarts A. Surface-active substances and detergents // ed. Foreign Literature, Moscow, 1960, p.152. [In Russian].

4 Sokolova N.F. Methodological basis for determining the resistance of microorganisms to disinfectants // Materials of the VIII Congress of the All-Russian Society of Epidemiologists, Microbiologists and Parasitologists. 2002. 4, P.55-56. [In Russian].

5 Krasilnikov A.P. Handbook of antiseptics. Mn .: Vysh. shk. 1995. 367 p.

6 Ryan T.P., Aust S.D. The role of iron in oxygen-mediated toxicities // Grit. Rev. Toxicol. 1992. Vol.22. P.119-141. [In Russian].

7 Alam M.Z., Ohgaki S. Role of hydrogen peroxide and hydroxyl radical in producing the residual effect of ultraviolet radiation // Water Environ Res. 2002. Vol.74. P.248-255. [In Russian].

8 Method of disinfection of environmental objects / O.V. Bukharin, A.V. Sgibnev, S.V. Cherkasov: pat. 2321426, Ros. Federation. No. 2006128009/15; claimed. 01.08.2006; publ. 10.04.2008. Bul. No. 33. [In Russian].

9 Modern technologies for production control that increase the level of industrial safety at oil and gas facilities / R.A. Kuskildin, N.Kh. Abdrakhmanov, Z.A. Zakirova, E.F. Yalalova, K.N. Abdrakhmanova, V.V. Voroshkko // Problems of collecting, preparing and transporting oil and oil products, 2017. No 2 (108). P. 111-120. [In Russian].

10 Systems for assessing the risk of emergencies at oil and gas facilities / N.Kh. Abdrakhmanov, Z.A. Zakirova, G.F. Zalyaeva, R.A. Kuskildin // Oil and Gas Business, 2017. V. 15, No 1. P. 226-230. [In Russian].

### **Сведения об авторах**

#### **About the authors**

Савичева Ю.Н., канд. техн. наук, доцент кафедры «Промышленная безопасность и охрана труда» ФГБОУ ВО «УГНТУ», г. Уфа, Российская Федерация

Y.N. Savicheva, Candidate of Engineering Sciences, Associate Professor of the Chair «Industrial Safety and Labor Protection» FSBEI HE «USPTU», Ufa, Russian Federation

e-mail: ufa.savjulia@gmail.com

Закирова З.А., канд. техн. наук, доцент кафедры «Промышленная безопасность и охрана труда» ФГБОУ ВО «УГНТУ», г. Уфа, Российская Федерация

Z.A. Zakirova, Candidate of Engineering Sciences, Associate Professor of the Chair «Industrial Safety and Labor Protection» FSBEI HE «USPTU», Ufa, Russian Federation

e-mail: zakirovaza@mail.ru

Валиева А.В., студент гр. МБП01 17-01, ФГБОУ ВО «УГНТУ», г. Уфа,  
Российская Федерация.

A.V. Valieva, Student Group MBP01 17-01, FSBEI HE «USPTU», Ufa,  
Russian Federation

e-mail: waliewa.aliya2011@yandex.ru

Абдуллина Д.Р., студент гр. МБП01 17-01, ФГБОУ ВО «УГНТУ»,  
г. Уфа, Российская Федерация.

D.R. Abdullina, Student Group MBP01 17-01, FSBEI HE «USPTU», Ufa,  
Russian Federation

e-mail: dianka.abdullina.95@mail.ru