

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Воронежский государственный архитектурно-строительный
университет»

Кафедра химии

На правах рукописи



Брындина
Лариса Васильевна

БИОСОРБЦИОННАЯ ОЧИСТКА СТОЧНЫХ ВОД
ПРЕДПРИЯТИЙ АПК И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ
В АГРОЭКОСИСТЕМАХ

Специальность 03.02.14 – биологические ресурсы

Диссертация на соискание ученой степени
доктора сельскохозяйственных наук

Научный консультант
Полянский Константин Константинович – доктор технических наук,
профессор, заслуженный деятель науки Российской Федерации

Воронеж- 2016

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	
1. 1 Анализ состава сточных вод мясоперерабатывающей промышленности.....	11
1. 2 Анализ способов очистки сточных вод мясоперерабатывающих производств.....	13
1. 3 Перспективные технологии переработки осадков сточных вод.....	33
2 ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ УСЛОВИЯ И МЕТОДИКА ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ	
2. 1 Почвенно-климатические условия Центрально-Черноземного региона.....	43
2. 2 Метеорологические условия в годы проведения исследований.....	47
2. 3 Объекты исследования.....	52
2. 4 Методика исследований.....	53
2. 5 Оценка безотходности производств мясной промышленности.....	54
3 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПО ВЫБОРУ АКТИНОМИЦЕТА-ДЕСТРУКТОРА ТРУДНОРАЗЛАГАЕМЫХ БЕЛКОВ СТОЧНЫХ ВОД	
3. 1 Выбор продуцента ферментов, специфичных к белкам сточных вод предприятий мясной промышленности.....	59
3. 2 Влияние источников азота и углерода на биосинтез протеиназы <i>Str. chromogenes</i> s.g.0832.....	65
3. 3 Оптимизация питательной среды для актиномицета <i>Str. chromogenes</i> s.g. 0832.....	70

4	ИЗУЧЕНИЕ ФЕРМЕНТНЫХ СИСТЕМ <i>STR. CHROMOGENES S.G. 0832</i>	
4. 1	Получение комплексного ферментного препарата из культуральной жидкости <i>Str. chromogenes s.g. 0832</i>	84
4. 2	Исследование физико-химических свойств препарата протеиназы <i>Str. chromogenes s.g. 0832</i>	89
4. 3	Очистка протеолитического комплекса <i>Str. chromogenes s.g. 0832</i> ...	90
4.4	Влияние активаторов и ингибиторов на активность кератиназы и протеиназы <i>Str. chromogenes s.g. 0832</i>	96
4.5	Кислотная и термическая инаktivация протеиназы и кератиназы <i>Str.</i> <i>chromogenes s.g. 0832</i>	97
5	СОРБЦИОННЫЕ СВОЙСТВА КЛЕТОК <i>STR. CHROMOGENES S.G.</i> <i>0832</i> И ЕГО ФЕРМЕНТНЫХ СИСТЕМ	
5. 1	Сорбционные свойства <i>Streptomyces chromogenes s.g 0832</i> по отношению к белкам сточных вод мясной промышленности.....	109
5. 2	Сорбционные свойства <i>Streptomyces chromogenes s.g 0832</i> по отношению к ионам железа.....	119
5. 3	Сорбционные свойства <i>Streptomyces chromogenes s.g 0832</i> по отношению к жировым составляющим сточных вод.....	124
5. 4	Математическое моделирование процесса биофлокуляции <i>Streptomyces chromogenes s.g 0832</i>	127
6	ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ И ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРОЦЕССА ФЛОКУЛЯЦИИ КЛЕТКАМИ <i>STR. CHROMOGENES S.G. 0832</i>	
6. 1	Сравнительная характеристика эффективности применения актиномицета <i>Str. chromogenes s. g. 0832</i> и других флокулянтов для очистки сточных вод.....	143
6. 2	Экспериментальное обоснование выбора условий очистки сточных вод с помощью культуры <i>Str. chromogenes s.g 0832</i>	153

7 УТИЛИЗАЦИЯ ОСАДКОВ СТОЧНЫХ

- 7.1 Характеристика осадка сточных вод, полученного в результате обработки стоков *Str. chromogenes* s.g. 0832.....173
- 7.2 Использование осадка сточных вод в качестве органического удобрения.....180
- 7.3 Эколого-экономическое обоснование способов биосорбционной очистки сточных вод.....188

ВЫВОДЫ И ПРЕДЛОЖЕНИЯ.....196

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....198

ПРИЛОЖЕНИЯ

- Приложение А. Акт производственных испытаний способа очистки сточных вод на МПК «Ясные зори» филиала ООО «Белгранкорм».....235
- Приложение Б. Акт о полупроизводственных испытаниях по апробированию способа биосорбционной очистки сточных вод на ООО «Петровский мясокомбинат» (с добавлением в среду культивирования микроорганизма Al^{3+}).....238
- Приложение В. Акт о полупроизводственных испытаниях по апробированию способа биосорбционной очистки сточных вод на ООО «Петровский мясокомбинат» (с добавлением в среду культивирования микроорганизма ПАА)..... 241

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

Для обеспечения человечества продуктами питания, лекарственным сырьем и другими необходимыми для жизни источниками материальных благ используются биоресурсы. На суше (материковой части планеты) это в первую очередь продукция растениеводства и животноводства, которая требует соответствующей обработки. В результате чего на планете ежегодно образуется около $25 \cdot 10^9$ т отходов, в России – более $7 \cdot 10^9$ т. [97]. В нашей стране общий объем сточных вод постоянно увеличивается. По данным государственного доклада «О состоянии и об охране окружающей среды в Российской Федерации в 2014 году» было сброшено в водные объекты сточных вод 43890,8 млн. м³, без очистки и недостаточно очищенных – 14767,89 млн. м³. Как правило, сточные воды пищевых производств, и в частности, мясоперерабатывающих предприятий, подвергаются лишь грубой механической очистке с последующей доочисткой химическими реагентами. После чего они направляются на городские очистные сооружения или сбрасываются непосредственно в водоемы. Применение химических компонентов в очистке сточных вод мясоперерабатывающих производств не получило широкого распространения, в силу большой их стоимости и опасности для окружающей среды.

В нашей стране проблемой очистки сточных вод занимались многие ученые: М.А. Евилевич, Л.Н. Брагинский, С.В. Яковлев, Т.А. Карюхина, И.В. Скирдов, В.Н. Швецов [205,225,238]. За последние годы сделан большой шаг вперед в технологии очистки сточных вод, ужесточились требования к предприятиям.

В последние годы особое внимание уделяется биологической очистке сточных вод. На небольших предприятиях для этого используются лагуны, но из-за низкой эффективности и невозможности внедрить такую технологию на больших производствах, они не нашли применения.

Также в Центральном Черноземье пытались использовать для очистки сточных вод водный гиацинт (Эйхорния). Нитеподобные корни этого растения эффективно очищают воду от вредных химических примесей. Но данная технология не увенчалась успехом, так как создать должные условия для его роста и размножения на большой территории довольно сложно, растение требовательно к температурному и влажностному режиму, рассаду необходимо выращивать в теплице, что требует дополнительных материальных затрат, кроме того, растение не устойчиво к вредителям

В последнее время большое внимание уделяется технологиям очистки сточных вод с использованием микроорганизмов, которые на сегодняшний день разработаны в недостаточной мере. Поэтому решение данной проблемы является актуальным в современных условиях.

Следует отметить, что при очистке сточных вод образуется осадок – осадок сточных вод. При внесении ОСВ в качестве органического удобрения можно выделить как положительные, так и отрицательные стороны влияния ОСВ на агроэкосистемы.

Позитивные факторы связаны с улучшением почвенно-агрохимических свойств почвы: повышением содержания органического вещества, макро- и микроэлементов, увеличением микробной биомассы, повышением биологической активности ферментов, улучшением водно-физических свойств почвы [97].

Из негативных последствий можно выделить присутствие патогенной микрофлоры, наличие тяжелых металлов, несбалансированный химический состав [97]. Однако отрицательные стороны применения ОСВ можно снизить.

Осадок сточных вод мясоперерабатывающей промышленности в настоящее время не изучен, и вопрос его применения остается весьма актуальным.

В связи с этим, **целью** работы является – разработка способов биологической очистки сточных вод с применением актиномицета *Str.*

chromogenes s.g. 0832 и возможности использования образующегося осадка в качестве органического удобрения агроэкосистем.

В задачи исследования входило:

- 1) оценить качественный состав сточных вод мясоперерабатывающей промышленности и эффективность способов их очистки;
- 2) обосновать целесообразность использования актиномицетов в качестве биофлокулянтов и выбор компонентов питательной среды для продуцента кератинрасщепляющей протеиназы *Str. chromogenes s.g. 0832*;
- 3) изучить ферментные системы *Str. chromogenes s.g. 0832* и определить их физико-химические свойства;
- 4) разработать математическую модель процесса флокуляции *Str. chromogenes s.g. 0832*;
- 5) определить сорбционные свойства *Str. chromogenes s.g. 0832* к компонентам сточных вод;
- 6) установить эффективность применения *Str. chromogenes s.g. 0832* и других флокулянтов для очистки сточных вод;
- 7) оценить воздействие осадка сточных вод на почвенно-биотический комплекс и продуктивность агроценозов;
- 8) оценить уровень экологичности предприятий мясной промышленности и провести укрупненную оценку ущерба окружающей среде при внедрении предлагаемого способа очистки сточных вод.

Научная новизна

- 1 Установлены механизмы и факторы воздействия актиномицета *Str. chromogenes s.g. 0832* на очистку сточных вод.
- 2 Актиномицет *Str. chromogenes s.g. 0832* вполне конкурентоспособен современным синтетическим аналогам и может применяться для очистки сточных вод от органических загрязнителей.
- 3 Согласно разработанной математической модели наибольшая скорость процесса очистки сточных вод *Str. chromogenes s.g. 0832* наблюдается на

второй стадии флокуляции, где происходит рост и укрупнение центров флокуляции за счет конвективного потока примесей.

4 Применение биофлокулянта *Str. chromogenes s.g. 0832* позволит внедрить технологию оборотного водоснабжения, что повысит экологическую безопасность производства.

5 Осадок сточных вод является экологически безопасным и может быть использован в агроценозах Центрального Черноземья.

Практическая значимость

Разработанные приемы могут быть использованы в агроэкосистемах Центрального Черноземья при биологической очистке сточных вод. Технология очистки стоков апробирована в производственных условиях на МПК «Ясные зори» филиала ООО «Белгранкорм», ООО «Петровский мясокомбинат», патент РФ №2312073.

Разработанные способы использования осадка сточных вод в агроэкосистемах позволяют улучшить состояние почвено-биологического комплекса и увеличить количественные и качественные показатели производимой сельскохозяйственной продукции.

На защиту выносятся следующие основные положения:

1 Наиболее эффективным способом для очистки сточных вод мясной промышленности является использование биоресурсов.

2 Эффективность биосорбционной очистки актиномицетом *Str. chromogenes s.g. 0832* обеспечивают следующие механизмы и факторы:

- условия биосинтеза актиномицета (присутствие органического азота в виде соевой муки и пера, источника углерода – картофельного крахмала, микроколичеств FeSO_4 , ZnSO_4 , pH 7,0 – 9,0; $t=30 - 50^\circ\text{C}$, ионы Ca^{2+});
- условия биосорбции (pH 8,0 – 11,0, $t=20 - 30^\circ\text{C}$).

3 Осадок сточных вод целесообразно применять в качестве органического удобрения в агроэкосистемах.

Степень достоверности и апробация работы

Достоверность и обоснованность результатов исследования и выводов подтверждается большим количеством экспериментальных данных, их статистической обработкой с помощью пакета «Анализ данных» Microsoft Excel, использованием стандартных методик и ГОСТов, применением современных методов исследования и приборов, позволяющих выполнять эксперимент с высокой точностью, в пределах допустимой погрешности, проверкой результатов лабораторных исследований на реальных сточных водах предприятий.

Основные результаты работы доложены на III международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2005); международном форуме «Биотехнология и современность» (С.-Петербург, 2004); первой международной научно-практической конференции «Экологические и правовые аспекты эксплуатации водохранилищ» (Воронеж, 2003); VII международной научно-практической конференции «Высокие технологии в экологии» (Воронеж, 2004); I международном экологическом конгрессе «Экология и безопасность жизнедеятельности промышленно-транспортных комплексов» (Тольятти, 2007; 2009); III Всероссийской научно-технической конференции «Современные проблемы экологии и безопасности» (Тула, 2007); II международном экологическом конгрессе «Экология и безопасность жизнедеятельности промышленно-транспортных комплексов» (Тольятти, 2009), научно-практической конференции «Биотехнология: наука и практика» (Крым 2014), 7-мом международном научно-практическом симпозиуме «Перспективные ферментные препараты и биотехнологические процессы в технологиях продуктов питания и кормов» (Москва 2014), II Международной научно-технической конференции «Продовольственная безопасность: научное, кадровое и информационное обеспечение», проводимой в рамках реализации V агропромышленного конгресса и ассоциации «Технологическая платформа «Технологии пищевой и перерабатывающей промышленности АПК –

продукты здорового питания» (Воронеж 2015), XI международной научно-практической конференции «Наука и образование» (Германия, 2016), VI международной научно-практической конференции «Современные достижения биотехнологии. Новации пищевой и перерабатывающей промышленности (Ставрополь, 2016).

Личное участие автора

Личный вклад автора заключается в формулировании проблемы, постановке цели и задач исследования, выборе методологии для решения поставленных задач, планировании и проведении всех экспериментальных исследований в лабораторных и производственных условиях, теоретико-аналитической интерпретации результатов.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1. 1 Анализ состава сточных вод мясоперерабатывающей промышленности

Современный уровень развития пищевой промышленности, и в частности мясной отрасли, требует принципиально нового подхода к проблеме использования ресурсов. В условиях ухудшающейся экологической ситуации в России [20,108,189,292] необходима разработка технологий, предотвращающих загрязнение окружающей среды, способствующих уменьшению потребления природных ресурсов.

При этом предпочтение должно отдаваться мало- и безотходным технологиям [90,110,157,164,199,204]. Это позволит расширить ресурсные возможности и вовлечь в производство неиспользуемые отходы как новый источник получения продукции [38,45,213,221,298].

В производственном цикле мясного производства образуется значительный поток отработанных технологических жидкостей. Большая часть этих жидкостей содержит белковые вещества. Потери животного белка при контакте мяса с водой могут составлять до 100г на 1м³ воды [14].

Загрязнение технологических жидкостей имеет место при тепловой обработке сырья и полуфабрикатов, при проведении операций посола и санитарной обработке сырья и готовой продукции. Значительная часть белкового сырья теряется вследствие адгезии к стенкам рабочих органов оборудования и тары и переходит в отработанные воды при их санитарной обработке.

В общем стоке мясокомбинатов присутствуют взвешенные вещества, жиры, органические вещества в виде кусочков тканей животных, крови, волоса, щетины. В процессе производства используются NaCl, нитраты и нитриты, поэтому в стоке много хлоридов, отработанных растворов нитратов и нитритов. В большом количестве используются моющие

средства, дополнительно засоряя сточные воды фосфором (P_2O_5), кальцинированной содой (Na_2CO_3) [151].

Сточные воды мясокомбинатов, мясоперерабатывающих заводов характеризуются слабощелочной реакцией (рН среды изменяется в интервале 7,0 – 7,6) [151]. Температура стоков меняется от 12 до 27⁰С в зависимости от сезона. Ее значение важно для биологических аэробных процессов, протекающих в сточных водах. Повышение температуры до 35 – 40⁰С, как и понижение – до 0⁰С резко снижает скорость биологических процессов, протекающих в стоках [235].

По фазово-дисперсному состоянию состав сточных вод в основном представлен органическими примесями белкового происхождения. Более 70% загрязнений приходится на белково-жировые комплексы (коллоиды – 10%, суспензии – 20%, растворимые – 50%, осаждающиеся примеси – 20%) [232].

На предприятиях отрасли применяются различные схемы очистных сооружений. Для предприятий большой мощности с большим объемом сточных вод, с широким спектром загрязняющих веществ характерны сложные схемы очистки сточных вод. Простые схемы очистки рассчитаны на сточные воды с однотипными показателями загрязнений и применяются на предприятиях средней мощности. Они располагаются, как правило, у первоначальных источников слива сточных вод с применением специфического оборудования в зависимости от вида загрязнителя [232].

Но наиболее разумным было бы полное прекращение поступления в окружающую среду вышеназванных загрязнений и создание замкнутых технологических циклов с повторным водоснабжением. В зависимости от состава образующихся сточных вод такие схемы очистки стоков можно располагать в виде модулей в цехах, или на специально отведенной территории предприятия. Такое технологическое решение позволило бы, прежде всего, сократить объемы потребления воды, а также предотвратить

потери животного сырья, используя его на производство кормовой муки, органических удобрений.

Следует отметить, что в России по сравнению с другими странами к качеству очищенных сточных вод предъявляются наиболее высокие требования [1,2,14,153,162,190].

Нормативные требования к качеству отводимых в городскую канализацию очищенных сточных вод резко отличаются от требований при отведении сточных вод в природные водоемы. Предприятия обязаны довести качественный состав сточных вод до нормативных значений, после чего, им будет разрешено сбросить их в городскую канализацию [161]. Для большинства мясоперерабатывающих предприятий это условие превращается в серьезную проблему. Особенно остро вопрос встает для небольших мясоперерабатывающих производств, с расходом сточных вод 50-500 м³/сутки. Такие предприятия, как правило, располагаются в арендуемых помещениях, имеют ограниченные возможности для размещения локальных очистных сооружений. Они ограничиваются примитивными отстойниками, которые не могут обеспечить требуемое качество сточных вод для сброса в городскую канализацию и продолжают сбрасываться неочищенные сточные воды в водоемы [190].

1.2 Анализ способов очистки сточных вод мясоперерабатывающих производств

Несмотря на довольно сложный физико-химический состав отработанных технологических жидкостей (тяжелые и легкие взвеси, разнообразная микрофлора, органические и минеральные вещества), на эффективность очистки основное влияние оказывает белковая природа этих систем [235,240]. Поэтому наиболее эффективными способами очистки стоков мясной промышленности считаются коагуляция и флокуляция с последующим отстаиванием, фильтрацией или флотацией

[88,100,131,132,136,160,165,166]. Данные зарубежных исследований показывают, что повысить эффективность очистки сточных вод можно подбором соответствующих коагулянтов и флокулянтов [39–41,43,46,48,267], а также физическими воздействиями на обрабатываемую воду (например, электрические, магнитные поля, ультразвук и др.) [50,130,133,135,137–139,152].

Коагулянты и флокулянты способствуют увеличению скорости осаждения взвешенных частиц. Увеличение среднего размера частиц в результате коагуляции (процесс слияния частиц при соприкосновении друг с другом) значительно облегчает последующее осаждение [23,26,31,142,229].

Совместное использование коагулянтов и флокулянтов позволяет в ряде случаев достичь установленных нормативов качества очистки воды, сбрасываемой в водоем [28,100].

Совершенствование технологии получения коагулянтов и флокулянтов позволит еще больше расширить использование этих реагентов для очистки сточных вод. Большие резервы интенсификации метода коагуляции и флокуляции связаны как с более глубоким исследованием механизмов явлений, сопровождающих эти процессы [143,202,203], так и с поиском новых более эффективных флокулянтов [128,129,174–179].

В качестве высокомолекулярных флокулянтов применяют самые разнообразные химические соединения. Большинство авторов [142,209,210] их подразделяет на три группы: неорганические полимеры; природные высокомолекулярные вещества и синтетические органические полимеры.

Из неорганических флокулянтов наибольшее распространение получила активная кремниевая кислота (АК). Она является анионным полиэлектролитом. Способы получения растворов АК, продолжительность и условия хранения растворов, другие факторы влияют на свойства АК, степень полимеризации и др.

Впервые природные высокомолекулярные соединения применяли для очистки воды еще до нашей эры в Индии, яичный белок – для осветления вин в Греции [23].

Интенсивное использование флокулянтов началось с 50-х годов, после того как Ла Мер в США предложил использовать картофельный крахмал для ускорения седиментации и обезвоживания шламов уранового производства и обогащения фосфорсодержащих руд. С тех пор начались интенсивные исследования по выделению флокулянтов из природного сырья [63,64].

Наибольшее распространение получили крахмал, целлюлоза и их производные, гуаровые смолы, гумусовые вещества и некоторые другие. Они представляют собой анионные полиэлектролиты, молекулярная масса которых колеблется от нескольких сот тысяч до нескольких миллионов. Преимуществом природных флокулянтов является их безвредность для человека и отсутствие токсических веществ.

Крахмал состоит из двух полимерных углеводов – линейного амилозы и разветвленного амилопектина. Молекулярная масса амилозы – несколько сот тысяч, амилопектина – несколько миллионов. Крахмалы, получаемые из различного сырья, отличаются по содержанию амилопектина и амилозы, поэтому имеют различную молекулярную массу и, соответственно, флокулирующую способность. Отрицательный заряд растворимого крахмала обусловлен присутствием в амилопектине (возможно, и в амилозе) небольших количеств эфиров фосфорной кислоты $\text{CH}_2\text{OPO}(\text{OH})_2$ [92].

Наилучшими флокулирующими свойствами обладает картофельный крахмал, состоящий на 80% из амилопектина и содержащий до 0,13% фосфора [92]. Крахмалы, не содержащие эфиров фосфорной кислоты, обладают слабой флокулирующей способностью в нейтральной среде, но эта способность существенно улучшается в сильнощелочных растворах ($\text{pH} > 10$), когда происходит диссоциация слабокислотных ОН-групп ядра α -глюкозы. При этом значительно увеличивается объем полимерного клубка вследствие

отталкивания одноименно заряженных групп, что, естественно, способствует росту флокулирующей активности полиэлектролита.

На основе крахмала были синтезированы эффективные катионные флокулянты – аминированные крахмалы. Они получают аминированием, то есть замещением гидроксильных групп элементарных звеньев на аминогруппы. При этом получают крахмалы, в состав которых входят третичные аминогруппы $-\text{OCH}_2\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$ или соли четвертичных аммониевых оснований $-\text{OCH}_2-\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_3\text{Cl}$. Степень замещения гидроксильных групп в катионных крахмалах находится в пределах 0,1–0,25 [100]. Эти реагенты являются хорошими флокулянтами многих дисперсий, в том числе суспензий минералов, бытовых и производственных сточных вод.

В последние годы применяют привитые крахмалы. В этих соединениях к основной цепи крахмала прививают синтетические полимеры (полиакриламид, полиакриловая кислота, эфиры полиметакриловой кислоты и др.), образующие боковые цепи полиэлектролита. Они получают полимеризацией соответствующих полимеров в присутствии крахмала, причем содержание привитых компонентов в конечном продукте может достигать 50% [100].

При обработке крахмала хлорноватистой кислотой получают окисленный крахмал – продукт, в котором одновременно с декстринизацией часть гидроксильных групп боковых цепей окислена в карбоксильные. Они представляют собой анионный полиэлектролит, который успешно применяют как флокулянт глинистых частиц [100].

Флокулянты на основе крахмала во многих странах применяют для очистки питьевой воды. Коммерческие названия флокулянтов на основе крахмала: Виспрофлок, Перфекамил, Пермутит, Флок-Эйд (США, Англия, Нидерланды, ФРГ), Неогум, Азим (Франция), Флокгель (Нидерланды), Флокаль (Чехия) и др. [100].

В качестве неионого флокулянта широко применяется декстрин. Это крахмал с уменьшенным содержанием амилозы, имеющей макромолекулы

меньших размеров. Он считается более эффективным, чем сам крахмал в широком интервале pH [100].

При обработке карбонатом натрия высушенных морских водорослей *Laminaria*, *Cystosira barbara* получают природный флокулянт – альгинат натрия. Он представляет собой соль полиальгиновой кислоты, имеющей состав основного звена $C_5H_5O_2(OH)_2 - COOH$, молекулярную массу 15 – 170 тыс. и являющийся типичным представителем анионного полиэлектролита.

Альгинат Na и его смеси с минеральными коагулянтами применяют для очистки природных и сточных вод в США (Кельджин W, Келькзоль), Японии и Англии (Велгум), Болгарии (Барбафлок BF-115), Франции (Альгинат F) и других странах [232]. В нашей стране альгинат Na использовался в пищевой и других отраслях промышленности.

Другим известным природным флокулянтом являются производные целлюлозы. Целлюлоза в воде нерастворима, поэтому она служит лишь сырьем для получения из нее производных – метил-, карбоксиметил-, оксиэтилцеллюлоз и других водорастворимых анионных полиэлектролитов.

Наиболее распространенным производным целлюлозы является натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы (Na-КМЦ), имеющая состав:



Na-КМЦ получают обработкой щелочной целлюлозы хлоруксусной кислотой в присутствии щелочи. Растворенный в воде Na-КМЦ сильный анионный полиэлектролит (М.в. 40 – 450 тыс.). В малых дозах применяется для обработки питьевой воды [100].

Активным началом флокулянтов на основе гуаровых смол является галактоманноза $C_5H_5O_2(OH)CH_2OH$, которая имеет разветвленную молекулярную цепочку и молекулярную массу ≈ 220 тыс. Этот полимер имеет высокую флокулирующую активность. Относится к классу неионных флокулянтов.

Получают гуаровые смолы экстракцией семян бобового растения *Cyamopsis psoralea* в виде белого или серого порошка. В РФ применяются

в пищевой промышленности, в США и некоторых других странах (Джагуар MGL, Суперфлок, Гуартек) – для обработки питьевой воды и других целей.

Щелочным дезацетилированием природного полисахарида хитина (в больших количествах выделяется при переработке морских ракообразных) получают еще один природный флокулянт – хитозан. Он представляет собой поли-(1,4-β, Д-глюкозамин), элементарное звено: $C_5H_5(OH)(NH_2)CH_2OH$. Молекулярная масса – $5 - 15 \cdot 10^4$ [227].

Хитозан не растворяется в воде, но хорошо – в органических кислотах (муравьиной, уксусной и др.). Аминная группа придает хитозану свойства катионного полиэлектролита. Наиболее эффективно его действие в нейтральной и кислой средах. Хитозан образует комплексные соединения с солями тяжелых металлов (ртути, хрома, железа, меди, свинца и др.) и может быть использован для их извлечения из воды. Хитозан применяют для очистки природных, бытовых и промышленных сточных вод, извлечения из сточных вод протеинов, улучшения прокрашиваемой бумаги, концентрирования бактериальных культур и других целей. Преимуществом хитозана является также его нетоксичность. В РФ также применяются алкилхитозаны [227].

Для очистки сточных вод мясо- и птицекомбинатов рекомендованы лигносульфоновые кислоты и их соли. В качестве флокулянта используют очищенные соли сульфитных щелоков, получаемые при производстве сульфитной целлюлозы. Молекулярная масса анионных полиэлектролитов 2-100 тыс.

Для очистки природных и сточных вод в некоторых странах используют водные вытяжки и соки некоторых растений, агар-агар, белковые дрожжи, протеин и нуклеинсодержащие вещества, выделяемые из отходов пищевой промышленности и т.п.

Синтетические высокомолекулярные флокулянты получили гораздо более широкое применение, чем флокулянты природного происхождения,

так как имеют большую молекулярную массу. Среди них выделяют неионные, анионные и катионные флокулянты [156,250,254,255,258].

Наиболее распространенным и эффективным неионным флокулянтom является полиэтиленоксид (ПЭО) (полиоксиэтилен) [218]. В США ПЭО выпускается под названием Полиокс – коагулянт, в Японии – Алокс Е-65. ПЭО считается хорошим флокулянтom для дисперсных систем.

Одним из известных анионных флокулянтom является полиакриламид (ПАА) [100]. В РФ выпускается ПАА-1, ПАА-ГС, в США, Японии, ФРГ, Франции, Италии – Сепаран, Суперфлок 16,20 и 84, Пулифлок А- 22, Могул СО-983, Кей-Флок, Полифлок, Седипур, NP-20. Полиакриламиды являются малотоксичными соединениями, широко применяются в водоподготовке, в очистке промышленных сточных вод, для флокуляции и флокулярной флотации (флотация с предварительным агрегированием частиц с помощью флокулянтom) большого числа минеральных суспензий.

Так как коллоидные примеси природных и промышленных сточных вод в большинстве своем заряжены отрицательно, то наиболее эффективными регуляторами устойчивости дисперсий являются катионные флокулянты. Среди них известен как флокулянт полиэтиленимин (ПЭИ). Высокой флокулирующей способностью по отношению к отрицательно заряженным дисперсным частицам обладают полиаминоалкиловые эфиры метакриловой кислоты (ПААЭМАК) [63].

В промышленных масштабах полимер ПААЭМАК и его сополимеры с акриламидом и метакриламидом выпускают фирмы США (Херкофлоки 821, 859), Япония (Санфлоки 029Р и др.), ФРГ (Диапрозим ХК) в виде порошков и водных растворов.

В последнее время на рынке флокулянтom широко рекламируются флокулянты южнокорейского производства Besfloc (компании «Kolon Life Science»). Эти полимеры применяются в горнодобывающей промышленности, бумажно-целлюлозной и текстильной отраслях в дополнение к коагулянтам. Флокулянты Floram (акриламидный полимер)

производства французской компании SNF Floergerr применяются в химической и нефтехимической промышленности также после коагуляции. Флокулянты Magnafloc на основе акриламида (швейцарская фирма Ciba Specialty Chemicals) используются в очистке питьевой воды достаточно результативно, но также как и предыдущие – вносятся после коагуляции. Флокулянт Zetag этой же фирмы имеет мировое признание среди флокулянтов, и нашел свое место в очистке стоков нефтеперерабатывающей, кожевенной, химической промышленности. Продукция совместного российско-германского производства ЗАО «Компания Москва-Штокхаузен-Пермь» флокулянты Praestol (на основе акриламида) завоевали популярность во многих областях промышленности за рубежом и в нашей стране [64,65].

Рассмотренные выше флокулянты лишь незначительная часть их большого количества, известного мировой практике. Каждый из флокулянтов, представляющий определенную группу имеет как положительные, так и отрицательные стороны. Например, флокулянты природного происхождения, как правило, нетоксичны, но из-за невысокой молекулярной массы в сравнении с известными полимерами, проявляют худшие флокулирующие свойства. Последние – как правило, токсичны.

Решение проблемы заключается в поиске новых флокулянтов, совмещающих в себе положительные стороны тех и других. В настоящее время широкое развитие получили биотехнологические методы производства флокулянтов.

В качестве биофлокулянтов, например, в виде клеток микроорганизмов и продуктов их метаболизма, могут быть использованы активный ил, образующийся при биологической очистке производственных сточных вод в различных отраслях промышленности, в частности, в химической, микробиологической, пищевой [8–10,25,218,230,231,242,244,253].

Сорбционные и флокулирующие свойства активного ила можно использовать для агрегации коллоидных и грубодисперсных примесей сточных вод [4,21,54,71,72,124,140,270]. Активный ил сорбирует такие

вредные вещества, как тяжелые металлы [51,52,121]. В биокоагуляции, применяемой на практике для очистки сточных вод, еще мало используются сорбционные и флокулирующие свойства активного ила.

Природа сил адсорбции (адгезии) микроорганизмов аналогична адсорбции коллоидов, а размер микроорганизмов (1–10 мкм), относит их к категории частиц, подверженных наиболее сильной адгезии. [8–10]. Способность клеток к адсорбции во многих случаях определяется свойствами микроорганизмов [62,63,323,324,334,338]. При этом лучше сорбируют палочковидные клетки или клетки, имеющие как можно больше образований (жгутики, выросты и т.п.) [98]. Важную роль в этом процессе играют гидратационные эффекты [15,16,192,208,281,282,285], обусловленные гидрофильностью и гидрофобностью клетки и носителя.

Флокулирующие свойства активного ила можно значительно повысить, получая его биомассу, удовлетворяющую необходимым требованиям. Достаточно эффективные флокулянты образуются из активного ила, предварительно подвергнутого химической обработке.

Изучен механизм воздействия биофлокулянтов (дрожжей, бактерий активного ила) на осветление тонкодисперсных суспензий фосфоритового флотоконцентрата [76,252,254,259]. Экспериментальные исследования и анализ литературных данных позволили предположить, что флокулирующие свойства микроорганизмов в процессах очистки сточных вод и осветления тонкодисперсных суспензий, содержащих преимущественно минеральные взвешенные вещества коллоидных размеров и выше, обусловлены адсорбционным взаимодействием микроорганизмов и поверхностей взвешенных минеральных частиц. Звягинцев Д.Г. выделяет химические связи между клетками микроорганизмов и поверхностями частиц; связи, образуемые ионными парами и ионными триплетами; силы электростатической природы; ван-дер-ваальсовы силы; поверхностные силы и др. [102]. При адсорбции клеток действуют также силы отталкивания между одноименно заряженными поверхностями и силы, обусловленные

образованием сольватных слоев. В зависимости от преобладания тех или иных сил взаимодействие клеток микроорганизмов с поверхностями минеральных частиц, может быть сильным или слабым [300,308,318]. Появление отмеченных выше сил зависит и от физико-химических свойств жидкой фазы.

Рассмотренные особенности действия биофлокулянтов характерны в первую очередь для клеток микроорганизмов. Особенности же действия биофлокулянтов, получаемых культивированием микроорганизмов в виде продуктов метаболизма, недостаточно изучены.

При использовании микроорганизмов в качестве флокулянта следует учитывать физико-химические характеристики, изменяющиеся в процессе их жизнедеятельности. Известно, что прочность связи при адсорбции микроорганизмов зависит от фазы их развития [29,44,102,105,141,323]. В начальные этапы развития микроорганизмов связь между адсорбентом и адсорбатом довольно прочная, а в более поздние этапы развития наблюдается уменьшение сил взаимодействия. Следует также отметить влияние pH и природы катионов на адсорбционные силы. При приближении pH среды к изоэлектрической точке уменьшается ξ – потенциал (дает представление о величинах электростатических сил отталкивания, а, следовательно, и об устойчивости коллоидных систем и увеличивается адсорбция. Этот вывод был подтвержден экспериментально при исследовании влияния pH и возраста культуры микроорганизмов на их флокулирующие свойства. С увеличением возраста культуры уменьшается флокулирующая способность микроорганизмов [29,121].

Таким образом, проведенный сравнительный анализ использования флокулянтов различного происхождения, позволяет сделать вывод о целесообразности применения биофлокулянтов в очистке сточных вод.

Способность бактерий использовать в процессе своей жизнедеятельности в качестве питания различные органические и минеральные вещества сточных вод является основой процессов

биологической очистки. Микроорганизмы имеют очень разнообразные физиологические возможности в отношении питательных веществ и условий окружающей среды, что позволяет удалять из сточных вод практически любые органические соединения[303,304,306,307]. Биологическая очистка позволяет добиться практически полного удаления органических веществ из сточных вод [36,37,206].

Адсорбция и биологическая обработка хорошо сочетаются при удалении из сточных вод органических загрязнений, взаимно дополняя друг друга в отношении типов молекул, которые они способны удалять [117,196,200,201,203,208].

В настоящее время адсорбционные свойства микроорганизмов изучены плохо. Ощущается острый недостаток биологических тестов на потенциальную способность микроорганизмов к очистке сточных вод.

Развитие биотехнологии позволило разработать несколько методов получения биофлокулянтов: в виде биомассы клеток микроорганизмов, в виде продуктов метаболизма.

Давно известно использование коагулирующих и сорбционных свойств активного ила. Его применение позволяет снизить концентрацию взвешенных веществ в сточных водах на 60 – 70% и БПК_{полн} на 15 – 25% [22,24,74,239].

Из литературных данных известно, что в биоценозах активного ила присутствуют актиномицеты, грибы, зеленые, сине-зеленые, эвгленовые микроводоросли. Так, например, в илах, формирующихся на фенолсодержащих стоках, (в том числе стоки производства основного органического синтеза), преобладают представители родов *Zoogloea*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, большинство из которых выделяют экзополимеры полисахаридной природы. Основная роль в биохимическом окислении загрязнений принадлежит аэробным бактериям, общее количество которых по данным разных авторов составляет $10^8 - 10^{12}$ клеток на 1 г сухого вещества [337].

Известны флокулирующие свойства бактерии *Kluyvera cryocrescens* КА–103 и подобрана оптимальная среда для культивирования микроорганизма. Установлено, что он активно агрегирует различные органические и неорганические примеси в сточных водах, особенно при добавлении ионов Ca^{2+} . Изучена возможность выращивания *Pseudomonas sp.* на среде со стоками от переработки рыбы [248,263,265,275].

В Японии удаление загрязняющих веществ из сточных вод осуществляли с помощью микроорганизмов *Pseudomonas*, *Serratia*, *Achromobacter*, *Thiobacillus denitrificans*, *Micrococcus denitrificans*, *Enterobacter sp. BY–29*, *Catenuloplanes japonicus* [255,263,320,330].

Установлена высокая эффективность обесцвечивания сточных вод клетками *Rhizomucor pusillus* [249,296].

Выделены и идентифицированы мицелиальные грибы родов *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Spicaria*, *Hyaloflorae*, *Saccharomyces cerevisiae* для обработки сточных вод [296,301,305.310–313,317].

В Великобритании разработан способ биodeградации загрязняющих веществ из сточных вод бактериями *Bacillus gordonae* (NCIMB 12553), *Bacillus benzeovorans* (NCIMB 12555), *Pseudomonas putida* (MCIMB 9776) В Греции изучена возможность удаления кадмия из сточных вод с помощью *Actinomycetes* шт. АК 61 и Л322. Степень удаления кадмия более 95% [251,291,309,314].

Способность микроорганизмов накапливать тяжелые металлы нашла применение в очистке сточных вод от меди, свинца, урана, цинка и др. Причем по эффективности связывания тяжелых металлов микроорганизмы превосходят некоторые ионообменные смолы и древесный уголь. В ряде исследований показано, что мицелий некоторых нитевидных грибов способен поглощать тяжелые металлы из раствора. *Rhizopus arrhizus* и *Penicillium chrysogenum* по эффективности связывания урана превосходят некоторые ионообменные смолы и древесный уголь. Кроме урана биомасса грибов поглощает торий, радий хром, свинец, медь, кадмий и цинк. Авторы

отмечают, что эффективность сорбции тяжелых металлов микроорганизмами связана, в том числе и со структурой мицелия, которая повышает эффективность сорбции [180,266,268,313].

В институте физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН учеными разработана сорбционно-биологическая очистка сильно загрязненных почв *Paracoccus denitrificans* [193,197].

Научно-исследовательский центр токсикологии и гигиенической регламентации биопрепаратов предлагает эффективный метод очистки почв штаммом *Rhodococcus globerulus* 19 Ф [207,321].

Учеными Тверского государственного химического университета предложена сорбция фенолов биомассой *Bacillus megaterium*. Для удаления органических веществ из сточных вод используют биомассу микроорганизмов. Известно, что биомасса за счет высокоразвитой поверхности способна извлекать значительные количества вредных веществ из водных растворов [71,72,195,276,278-280].

Для протекания процесса с наилучшим эффектом необходимо иметь специфичную микрофлору, содержащую ферментные системы, необходимые для деградации загрязнений; поверхность с сильной адсорбционной способностью, возможность образовывать стабильные флоккулы, легко осаждаемые при отстаивании [106,158,236,244,247,271]. Все эти условия присутствуют в биосорбционном процессе, который можно рассматривать как совокупность нескольких процессов тесно переплетающихся между собой. В результате биосорбционной обработки стоков происходят адсорбция загрязнений на поверхности клеток микроорганизма, не исключается и биологическое окисление загрязняющих веществ микроорганизмами, в свою очередь возможна агрегация клеток на поверхности отработанной биомассы.

Совмещение биологических и адсорбционных стадий в единый «биофизико-химический» процесс может позволить максимально

использовать его преимущества и является перспективным направлением совершенствования технологии биологической очистки.

Биофлокулянты могут составить серьезную конкуренцию синтетическим и природным флокулянтам. Они, как и природные флокулянты, естественного происхождения, а значит, их отрицательное воздействие на окружающую среду будет сведено к минимуму или полностью отсутствовать. В то же время, биофлокулянты, так же, как и синтетические флокулянты, имеют высокую молекулярную массу, что играет важную роль в процессе флокуляции (чем больше молекулярная масса, тем лучше флокуляция) [143,145,209,210,226,315]. Они образуют устойчивые большие флокулы, которые легко осаждаются. Эти свойства биофлокулянтов позволяют обратить на них внимание, как на альтернативный способ очистки сточных вод [205,228,230,231].

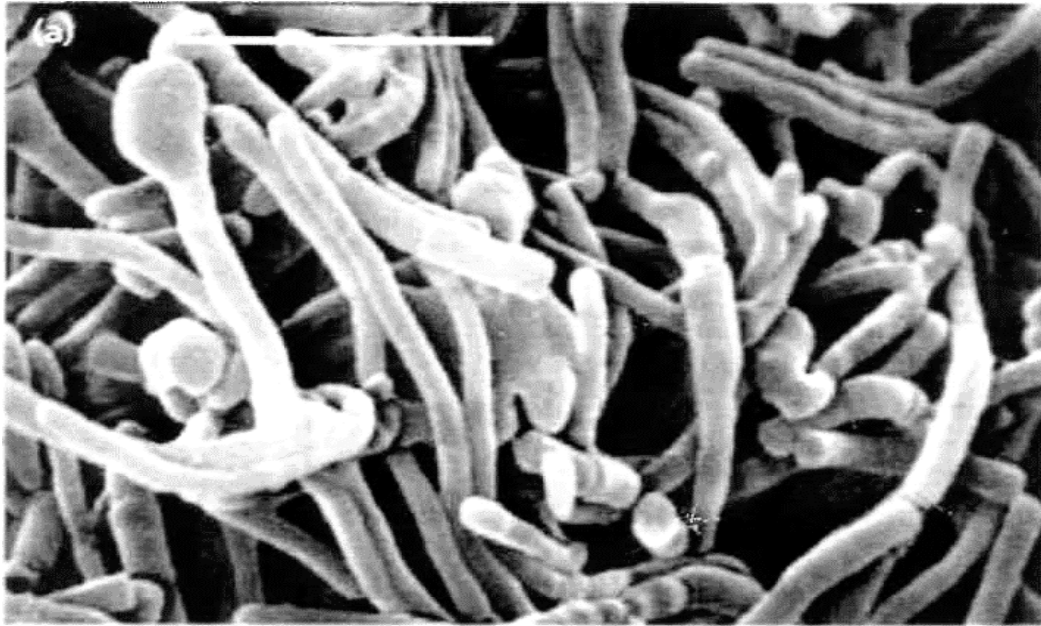
По литературным данным видно, что среди биофлокулянтов наибольшее применение нашли бактерии родов *Pseudomonas*, *Bacillus*, а также микроскопические грибы *Penicillium*, *Aspergillus* [311,320,331,335,336]. Актиномицеты в этом направлении изучены недостаточно. Несмотря на то, что в состав активного ила входят, актиномицеты, их сорбционные свойства, а также возможность использования в качестве самостоятельного флокулирующего агента остаются до настоящего времени практически неисследованными.

Актиномицеты представляют особую группу грамположительных бактерий со сложным онтогенезом. Изучением водных актиномицетов занимаются многие иностранные ученые: Okami Y., Okasaki T., Minser T., Moran M. и другие. Согласно их данным существенной и неотъемлемой частью микробного сообщества любой водной экосистемы являются актиномицеты рода *Streptomyces*. Это наиболее доминирующая и распространенная группа, обитающая в донных осадках [293,294], однако, она также встречается в воде [211]. Моран М. доказал водное происхождение рода *Streptomyces* [294]. Благодаря лабильности ферментативного аппарата,

представители рода *Streptomyces* легко приспосабливаются к изменяющимся условиям среды обитания, а высокая антагонистическая активность позволяет им подавлять или полностью угнетать жизнедеятельность других бактерий [70,212,273,284,286]. Обладая этими свойствами, актиномицеты оказывают влияние на экологию всего микробного сообщества, на его состав и видовое разнообразие. В результате изменяется природа и скорость трансформации биогеохимических веществ, что влияет на круговорот органического вещества в целом. Преимущество представителей рода *Streptomyces* заключается в том, что они способны минерализовать весьма устойчивые и труднодоступные для других микроорганизмов органические вещества, такие как хитин, целлюлоза, гемицеллюлоза, лигнин, водный гумус, фенольные соединения, фибриллярные белки (кератин, коллаген), которые попадают в водоем из окружающей среды или образуются при отмирании фитопланктона и высшей водной растительности [104,111]. Известно, что представители рода *Streptomyces* способны расти на очень бедных по содержанию органического вещества средах, то есть являются олигокарбофилами. Кроме того, эти актиномицеты жизнеспособны в низкотемпературных условиях, а их споры устойчивы к высокому давлению кислорода [260,283,319,325,332,333]. Поэтому, большой интерес представляет изучение рода *Streptomyces* как биофлокулянта в очистке сточных вод.

Бактериальные клетки актиномицета *Streptomyces chromogenes* s. g.0832 имеют вид тонких длинных ветвящихся нитей (рис. 1.1), которые позволяют увеличить удельную поверхность. Но не смотря на то, что биосорбенты, полученные на основе почвенных микроорганизмов, характеризуются низкой удельной поверхностью ($1-2 \text{ м}^2/\text{г}$), по сравнению с минеральными сорбентами ($10-150 \text{ м}^2/\text{г}$), они отличаются высокой плотностью центров сорбции, которая позволяет им быть эффективными сорбентами [127,184,272]. Кроме того, клеточная стенка актиномицетов, как и всех грамположительных бактерий, состоит в основном из гликопептида

(пептидогликана, муреина), тейховых кислот и полисахаридов. На долю пептидогликана приходится 50% общего количества аминокислот и аминсахаров клеточных стенок [62]. На внешней поверхности клеток отдельных представителей обнаружены фибриллоподобные структуры диаметром 4 – 8 нм. В лизирующихся клетках *Streptomyces sp.* описаны структуры необычной формы в виде гибких длинных нитей диаметром 150 – 170 Å с внутренним каналом и структуры, имеющие форму усеченного рифленого конуса диаметром 900 и 650 Å соответственно для основания и вершины [188,211,288]. Толщина актиномицетного мицелия обычно варьирует от 0,5 до 2,0 мк. Однако уже при первом исследовании актиномицетов с помощью электронного микроскопа в препаратах наряду с обычным мицелием был замечен мицелий, толщина которого составляла лишь 0,1 мкм и менее [188].



а



б

Рисунок 1.1 Микрофотографии воздушного мицелия актиномицета *Streptomyces chromogenes* s. g.0832 (увеличение 15х 90): а) воздушный мицелий; б) взвешенные вещества и коллоиды стока, сорбирующиеся на поверхности мицелия[184]

Мицелию актиномицетов свойственны три типа ветвления, которые наблюдаются также и у грибов, а именно: моноподиальное, дихотомическое и мутовчатое. Гифы большинства актиномицетов ветвятся моноподиально. При развитии на плотных питательных средах многие актиномицеты образуют два типа мицелия: 1) мицелий, проникающий в субстрат и (или) формирующий надсубстратную часть колонии; 2) мицелий, свободно ветвящийся в воздухе. Первый чаще всего называют первичным, или субстратным, а второй – вторичным, или воздушным. Воздушный мицелий отличается от первичного следующими чертами: он несколько толще; обычно несет темный нерастворимый пигмент; который связан с внешним слоем его оболочки; является гидрофобным. Гидрофобность – одна из наиболее бросающихся в глаза особенностей воздушных гиф. Лиске [287] нашел, что из воздушного мицелия извлекается органическими растворителями смесь каких-то веществ, «похожих на жиры».

Электронно-микроскопическое изучение воздушного мицелия актиномицетов показало, что на гифах находится тонкий покров (толщиной 10-20 нм), просматривающийся на срезах в виде контура, окружающего стенку гифы и нередко отстоящего от нее на некотором расстоянии.

Поверхность гиф актиномицетов, не выходящих на воздух, а развивающихся в субстрате не содержат такого покрова. Однако у отдельных представителей был обнаружен фибриллярный покров [287]. Отмечалось, что молодые гифы начинающего формироваться воздушного мицелия *Streptomyces antibioticus* содержат, в отличие от субстратных гиф, ядерные элементы с высоким содержанием ДНК [211]. По мнению некоторых исследователей, в воздушном мицелии могут с достаточной интенсивностью осуществляться процессы обмена. Молодые гифы воздушного мицелия *Streptomyces sp.*, особенно в момент начала образования, характеризуются, при сравнении их с гифами субстратного мицелия, повышенной концентрацией веществ, содержащих сульфгидрильные группы, а также повышенным уровнем активности таких ферментов, как щелочная

фосфотаза, каталаза и пероксидаза [62,84]. Многим представителям актиномицетов свойственно образовывать амицелиальные структуры, которые могут не иметь обязательного отношения к репродукции, но, по-видимому, имеют отношение к формированию клеток с повышенной устойчивостью к неблагоприятным воздействиям. При сравнительном рассмотрении таких структур создается впечатление, что они представляют собой ряд усложняющихся модификаций гиф и их агломератов. В начале этого ряда можно поставить коремии, которые часто наблюдаются в культурах актиномицетов. Они не являются собственно амицелиальными структурами и представляют собой тесные переплетения слипшихся гиф мицелия. Соседние коремии способны сливаться друг с другом путем образования как бы воздушных «мостиков» – пучков тесно переплетенных гиф [277]. Многие актиномицеты выделяют вещества, способствующие агрегированию их клеток. Нередко обнаруживаются участки мицелия и отдельные гифы, окруженные толстым слоем аморфного материала. Иммунологические исследования дали основание предположить, что в течение роста актиномицетов происходит экскреция мембранного комплекса, содержащего мукополисахариды и фосфолипиды [62,290].

Клетки многих микобактерий покрывает так называемый микозидный слой, содержащий ряд компонентов (специфические гликолипиды, пептидогликолипиды), характерных для клеточной стенки этих организмов [234]. Экстрацеллюлярный слой клеток микобактерий может быть достаточно мощным и хорошо структурированным. Эта особенность также может рассматриваться как условие, улучшающее процесс биофлокуляции.

На основании проведенного анализа можно отметить, что использование клеток актиномицетов в качестве биофлокулянтов является перспективным направлением по следующим причинам:

- актиномицеты в отличие от других представителей микроорганизмов могут достаточно быстро приспосабливаться к изменившимся условиям внешней среды, устойчивы к неблагоприятным воздействиям;

- структура мицелия актиномицетов позволяет предположить о возможности хорошей флокулирующей способности; их клеточные стенки состоят в основном из гликопептида, тейховых кислот и полисахаридов, что может усиливать флокулирующий эффект;

- при сравнении с флокулянтами природного происхождения актиномицеты имеют преимущество, выражающееся в более высокой молекулярной массе, которая непосредственно влияет на эффект очистки; при сравнении с искусственными флокулянтами преимущество выражается в нетоксичности биофлокулянтов при практически одинаковой молекулярной массе;

- биофлокуляция (биосорбция) – перспективное направление в очистке сточных вод, т. к. требует меньших затрат на осуществление процесса и гармонично вписывается в экосистему стока;

Таким образом, можно сделать следующие выводы: наиболее эффективным способом очистки сточных вод мясоперерабатывающих производств является биологическая очистка. Она основана на жизнедеятельности микроорганизмов, которые способствуют окислению или восстановлению органических веществ, находящихся в стоках в виде суспензий, коллоидов и являющихся источником питания для этих микроорганизмов.

Однако после биологической очистки сточных вод образуется большое количество осадка, которое требует переработки. Специфичный состав сточных вод мясокомбинатов: большое содержание белков, жиров, минеральных веществ, применяемых в технологическом процессе, влияет на качественный состав осадка, образующегося после очистки загрязненных стоков. Из-за высокой влажности и микробиологической обсемененности он требует быстрой утилизации, так как начинает гнить.

1.3 Перспективные технологии переработки осадков сточных вод

Осадки сточных вод, образующиеся на городских очистных сооружениях, относительно изучены по физико-химическому составу, для них разработаны методы обеззараживания и утилизации. Что же касается подобных исследований в отношении осадков сточных вод предприятий мясоперерабатывающей промышленности, то можно отметить, что они практически не проводились. В настоящее время проблема переработки осадков сточных вод (ОСВ) остается не решенной для мясокомбинатов. Существует реальная угроза ухудшения экологической обстановки. Чаще всего они вывозятся на свалки, создавая опасные очаги загрязнения окружающей среды. При этом безвозвратно теряются полезные компоненты, содержащиеся в осадках сточных вод.

Следует обратить внимание, что переработка биологических отходов, к которым можно отнести и образующиеся ОСВ, актуальна во всем мире. Так на основании доклада Enzo Favoino, председателя научного комитета «Ноль отходов Европы», и предложения «Комитета по окружающей среде, здравоохранению и безопасности пищевых продуктов», Члены Европейского Парламента на пленарном заседании 9 июля 2015 года приняли программу «Эффективность использования ресурсов: переход к круговой экономике», в которой, всем европейским странам рекомендуется внедрить отдельный сбор биоотходов к 2020 году [339]. На основании доклада конгрессмена Chellie Pingree «Food For Tomorrow 2015 – Новое предложение о пищевых отходах» [339] разрабатывается стратегический проект о компостировании и полном запрете вывоза органических отходов на свалки к 2020 году. Согласно докладу «Сокращение пищевых отходов может спасти мировую экономику 300 млрд. долларов в год» [340], неумеренное потребление и выбросы пищевых отходов на свалки по всему миру выделяет 3,3 млрд. т. метана в год или 7% всех выбросов парниковых газов, что, безусловно, сильно вредит окружающей среде.

Поэтому разработка новых технологий по утилизации органических отходов своевременна и актуальна [81]. В этой связи стоит обратить внимание на образующиеся после очистки сточных вод осадки. Их рациональное использование позволит не только снизить нагрузку на водные экосистемы, но и использовать в сельском хозяйстве для обогащения почв питательными органическими веществами.

В современных условиях наиболее распространенным способом утилизации осадков сточных вод является сжигание [182]. Преимущества в таком применении осадков сточных вод: малая площадь, необходимая для утилизации, независимость от времени года.

Но в последнее время в связи с ухудшающейся экологической обстановкой этот способ вызывает много критических замечаний. Прежде всего безвозвратно теряется большое количество органического вещества, газообразные продукты сжигания загрязняют атмосферу, высокая стоимость энергетических затрат на сжигание, так как предварительно осадки необходимо обезвоживать.

Технологические схемы обработки и последующего обезвоживания органического осадка и избыточного активного ила включают, как правило, следующие стадии – предварительное уплотнение, обезвоживание, термическую сушку (сжигание) [109,154,214]. Перед обезвоживанием органические осадки можно сбраживать или стабилизировать, а также концентрировать термореагентной обработкой.

Стабилизацию осадка осуществляют в аэробных или анаэробных условиях. При проведении аэробной стабилизации не требуется дополнительных больших затрат (строительство герметичных емкостей, нагревание и т.п.). Анаэробный процесс более сложный в реализации (устройство специальных сооружений), но при этом образуется метан.

Рациональное использование осадков сточных вод требует их уплотнения. Этот процесс, как правило, проводят в гравитационных или флотационных илоуплотнителях. При этом влажность ила снижается с 99,5 –

99,7% до 97%. Дальнейшее снижение влажности и уменьшение объема осадка проводят методами механического обезвоживания (вакуум - фильтры, центрифуги, фильтр-прессы). Влажность полученного таким образом продукта составляет 70 – 85% для вакуум-фильтров, 50 – 70% – для центрифуг, 40 – 75% – для фильтр-прессов [154].

Установлено, что обезвоживание более эффективно протекает после коагуляции, флокуляции, тепловой обработки, аэрации, замораживания с последующим оттаиванием. Выбор способа концентрирования осадков определяется величиной «водоотдачи» осадка, которая характеризуется удельным сопротивлением при фильтровании.

Сушку и обеззараживание кека проводят при температуре 60–80°C. Термореагентная обработка усиливает экстракцию водорастворимых белков и полисахаридов, которая приводит к флокуляции клеток микроорганизмов [158].

В Германии предложен способ сжигания активного ила с получением заменителей нефти и каменного угля. При сжигании 350 тыс. т. активного ила можно получить топливо, эквивалентное 700 тыс. баррелей (16 – 159л) нефти и 175 тыс. т. угля [153]. Полученное топливо удобно хранить. Выделяемая энергия расходуется на производство пара, который тут же используется. Показано, что более эффективно процесс пиролиза протекает с активным илом, загрязненным тяжелыми металлами, 90-95% которых концентрируются в твердой фазе. По-видимому, в этом случае тяжелые металлы играют роль катализаторов.

Твердые продукты пиролиза и неконденсированные газы могут служить источниками энергии для осуществления самого пиролизного процесса. Жидкие продукты пиролиза удобнее использовать в теплоэнергетических установках.

Важное значение имеют также методы утилизации активного ила, связанные с использованием его в качестве флокулянта для сгущения

суспензий [198], получения из активного ила адсорбента [210], в качестве сырья для получения стройматериалов [3] и т.д.

Приведенные в работе [3] данные показывают, что при внесении 0,38% сырого осадка и избыточного активного ила в образцы клинкеров их прочность на сжатие увеличивалась на 2,0 – 2,5 МПа соответственно на 7-е и 28-е сутки испытаний по сравнению с прочностью контрольных образцов. Свойства полученных образцов клинкеров с добавкой смеси сырых осадков и избыточного активного ила соответствуют требованиям ГОСТ. Проведенные токсикологические исследования показали возможность переработки сырых осадков и избыточного активного ила в цементном производстве [193].

Возможно использование осадка сточных вод в производстве керамики. Высокое содержание в осадке железа, магния и марганца позволяет применять его в качестве легирующих добавок, повышающих пластичность керамической массы, улучшающих условия ее спекания (снижение температуры) и технологические характеристики получаемой продукции (уменьшение размеров образующихся пор и улучшение влагопоглощающей способности). Кроме того, при производстве некоторых видов керамики можно применять осадок без предварительного обезвоживания (влажностью более 99%) в качестве водной добавки к формовочным массам, тем самым обеспечивается возможность использовать в керамическом производственном процессе осадок без его полного осушения.

Использование осадка сточных вод в качестве сырья для производства строительных материалов позволяет утилизировать его в производстве строительных материалов по следующим перспективным направлениям:

- в производстве грунта укрепленного техногенного (ГУТ), по ГОСТ 23558–94 (с изм. в 1998 г.), применяемого в качестве строительного вяжущего материала для стабилизации слабых грунтов и устройства нижних конструктивных слоев оснований дорог и промышленных площадок;

– в производстве цемента марок М200, М300 и М400. Полученный цемент может быть реализован при производстве сухих стабилизирующих смесей для укрепления грунтовых оснований дорог и площадок, оснований фундаментов зданий и сооружений, при производстве инженерных сооружений типа канализационных труб и коллекторных колец, элементов дорожных покрытий, таких, как: дорожные ограждения, тротуарные плитки и др.;

– в производстве штукатурных смесей и смесей, применяемых для снижения микро- и макронеровностей бетонных поверхностей. Внедрение данных производств позволит перерабатывать в полезный продукт весь объем отходов без затрат на организацию полигонов под складирование осадка.

Другое перспективное направление – применение активного ила в качестве субстрата для выращивания кормовых дрожжей [193,213].

Известен способ обработки активного ила, включающий кислотный гидролиз и щелочную экстракцию [214]. При кислотном гидролизе активный ил обезвреживается вследствие гибели патогенных микроорганизмов и образуются водорастворимые формы белковых, углеводных, минеральных веществ и витаминов. Полученный гидролизат можно использовать в качестве питательной среды для культивирования различных микроорганизмов. При щелочной экстракции происходит извлечение из активного ила водо- и щелочерастворимых белковых веществ. Практический интерес представляют способы совместного гидролиза активного ила и сырья растительного происхождения, например, древесины. Такой способ разработан в лесотехнической академии им. С.М. Кирова [205].

В странах Европейского сообщества большое значение придают развитию комбикормовой промышленности. Установлено, что активный ил, образующийся после биологической очистки сточных вод, обладает высоким кормовым качеством. Это в свою очередь диктует необходимость переориентации промышленных предприятий на производство кормовой

продукции. Фирма Simon-Garves разработала способ обработки активного ила с дальнейшим использованием его в качестве кормовой добавки [205]. Способ позволяет удалять из промышленных сточных вод более 90% таких тяжелых металлов, как цинк, кадмий, свинец. Для этого суспензию активного ила подкисляют до pH 1,0, при этом большинство металлов растворяется в жидкой фазе, затем добавляют флокулянт; суспензию разделяют механическим способом, и сгущенный продукт биомассы высушивают.

Активный ил в качестве кормовой добавки можно использовать как отдельно, так и в смеси с кормовыми дрожжами. Первый способ менее предпочтителен, что обусловлено трудностями обезвоживания суспензии активного ила. При получении смеси кормовых дрожжей с активным илом процесс обезвоживания осуществляется значительно проще и эффективнее [101].

Наиболее сложной частью создания технологии по использованию осадков сточных вод в качестве кормового продукта является подбор микроорганизмов, устойчивых к температурным изменениям, способных усваивать сложные органические остатки, слабо поддающиеся разложению [17,18].

Утилизация осадков сточных вод и избыточного активного ила часто связана с использованием их в сельском хозяйстве в качестве удобрения, что обусловлено достаточно большим содержанием в них биогенных элементов. По сравнению с минеральными удобрениями они одновременно содержат все необходимые питательные вещества и хорошо усваиваются почвами [17,18,101,116].

Установлено, что органическое вещество, вносимое в почву вместе с осадком сточных вод, увеличивает почвенную воду. Это объясняется тем, что в почву дополнительно вносятся спиртовые, фенольные группы, повышающие влагоемкость [97].

Следует обратить внимание и на такой способ утилизации осадков сточных вод как компостирование. В настоящее время обсуждаются вопросы

по внедрению перспективных технологий компостирования [220]. Интересно использование в промышленных компостах бытового мусора, отходов пищевого перерабатывающих предприятий, коммунального хозяйства городов. Кератиновые отходы (рога, копыта, перо и др.) продолжают оставаться серьезной проблемой для мясной и птицеперерабатывающей промышленности. Хотя по химическому составу – это концентрат белка (90–95%) с высоким содержанием незаменимых аминокислот. Трудности заключаются в том, чтобы перевести этот белок в растворимое состояние, сохраняя все аминокислоты данного белка. Решение проблемы возможно с помощью биотехнологии, а именно, путем использования специфических ферментов, разрушающих компактную структуру кератиновой молекулы.

Характер отходов, которые используются в компостах как наполнители, имеет важное значение в определении эффективности компоста.

Так в Германии компост на основе древесных опилок и растительных остатков при соотношении 1:2,3 имел хорошие агроэкологические показатели: содержание общего азота составило 1,86%, общего фосфора – 1,91%, кальция – 8,3%. По законодательству Германии, начиная с 2005г осадки, содержащие органического вещества более 5%, подлежат обязательной переработке. В Чехии компостирование проводят при следующем составе компонентов: 15 – 20% ОСВ; 30 – 60% – твердые бытовые отходы; 15 – 30% – гидролизный лигнин, 10 – 25% торф. По чешским нормативам содержание органического вещества в компостах не может быть ниже 30 – 36%, азота – 0,6 – 1%, фосфора – 0,3 – 0,5% [182].

Промышленное компостирование позволяет очистить территории населенных пунктов от свалок, ввести в биологический круговорот огромное количество органического вещества, которое безвозвратно теряется при процессах минерализации и достигает 10 – 30% от исходного содержания в зависимости от условий [182].

Можно отметить, что в комплексе агротехнических мероприятий по выращиванию сельскохозяйственных культур и повышению плодородия почв важное место занимают органические удобрения. Они обогащают почву элементами минерального питания, органическим веществом, улучшают водно-физические свойства, активируют другие полезные биологические и биохимические процессы.

Биологическая очистка сточных вод позволяет подобрать определенные штаммы микроорганизмов, которые будут целенаправленно разрушать сложные токсические соединения. Поэтому обеззараживание осадков на основе биотехнологии становится самым перспективным. Наиболее доступным способом их утилизации, экологически безопасным является компостирование с наполнителями.

Снижение содержания тяжелых металлов достигается сокращением сброса промышленных стоков в бытовую канализацию и внедрением замкнутого водоснабжения.

Несбалансированность химического состава ОСВ может быть устранена дополнительным внесением минеральных удобрений, четким подбором дозы вносимых ОСВ. При этом следует учитывать, что качество осадков имеет меньшее значение, если они применяются под технические культуры[182].

Рассмотренные способы утилизации осадков сточных вод, образующихся после очистки загрязненных стоков, показывают широкий спектр направлений, по которым возможно использование отработанной биомассы. Это позволит разрабатывать замкнутые технологии и существенно снизит отрицательное воздействие на окружающую среду.

В таблице 1.1 приведены способы утилизации осадков сточных вод в некоторых странах [182].

Таблица 1.1 Основные способы утилизации осадков сточных вод, (%)

Страна	Использование в сельском хозяйстве	Захоронение на свалках	Сжигание	Сброс в море, океан, др. технологии
Австрия	20	49	31	-
Англия	53	16	7	24
Германия	25	55	15	5
Дания	45	28	18	9
Италия	20	60	-	20
РФ	7	93	-	-
США	25	25	35	15
Финляндия	40	41	-	19
Франция	23	46	31	-
Швейцария	50	30	20	-
Швеция	60	30	-	10

По применению ОСВ в сельском хозяйстве в качестве органических удобрений первое место занимает Швеция, второе – Англия, третье – Швейцария. Россия в этом списке стоит на последнем месте (табл.1.1).

Проведенный литературный анализ позволяет сделать следующий вывод. К сожалению, проблеме очистки сточных вод предприятий агропромышленного комплекса, и в частности, предприятий мясоперерабатывающей промышленности, не уделялось должного внимания. Возможно из-за сложившегося стереотипного мышления, что пищевые предприятия не наносят серьезного вреда окружающей среде. А между тем сточные воды предприятий мясной промышленности характеризуются высоким содержанием органических веществ и биогенных элементов, сброс которых в водоемы без предварительной очистки может создать реальную опасность для окружающей среды, нарушить экологическое равновесие водных экосистем.

И здесь следует обратить внимание на создание безотходных технологий. Образующиеся после очистки сточных вод осадки создают еще одну проблему. На сегодняшний день их использование находится в

неудовлетворительном состоянии, хотя ОСВ богаты органическими полезными элементами, позволяющими утилизировать осадки сточных вод в качестве органических удобрений. В последнее время резко снижается плодородие почв. Внесение традиционных видов органических удобрений для их восстановления недостаточно. А применение осадков как удобрений сдерживается наличием в них тяжелых металлов, и возможным загрязнением почв. Для решения данной проблемы необходим дифференцированный подход к оценке доз внесения, влияния на почву, растения и т.п..

2 ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ УСЛОВИЯ И МЕТОДИКА ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1 Почвенно-климатические условия Центрально-Черноземного региона

Центрально-Черноземный район – один из главных агроэкономических регионов страны. В его состав входят Белгородская, Воронежская, Курская, Липецкая и Тамбовская области. Климатические условия характеризуются умеренной континентальностью, которая возрастает с северо-запада на юго-восток. Для районов с таким климатом характерно резкое колебание температуры и влажности воздуха. Осадки в течение года распределяются неравномерно, возможны засушливые периоды[5,6].

Среднегодовая температура воздуха составляет $5,0\text{--}6,4^{\circ}\text{C}$. Вегетационный период с устойчивыми температурами выше $+5^{\circ}\text{C}$ продолжается 185–195 дней, активная вегетация ($+10^{\circ}\text{C}$) – 165–170 дней. По влагообеспеченности Центрально-Черноземный район считается зоной умеренного увлажнения. Среднегодовая сумма атмосферных осадков составляет – 582–650 мм, из них в лесостепной зоне – 500– 650 мм, в степной – 450–490мм. Гидротермический коэффициент варьирует от 0,9 до 1,3 единиц, что указывает на достаточно засушливые условия[5].

Центрально-Черноземный регион представлен в основном черноземами, лесными, дерново-подзолистыми, лугово-черноземными почвами. Более чем на 80 % почвы Воронежской области представлены черноземами, 4,6% – высокоплодородные пойменные луговые почвы; и только десятая часть сельхозугодий покрыта низко продуктивными почвами овражно-балочного комплекса, песчаными, заболоченными, солонцами и солодами[155].

Территория области по характеру почв делится на лесостепную и степную части. Первая относится к Окско-Донской провинции с

распространением умеренно промерзающих типичных, выщелоченных, оподзоленных черноземов и серых почв лесостепи. Вторая – к Южнорусской провинции с распространением южных и обыкновенных черноземов степной почвенно-биоклиматической области[5,6].

Для Воронежской области характерна зональность почвенного покрова: подзона типичных черноземов сменяется подзоной черноземов обыкновенных при движении от северо-северо-западных границ области к юго – юго-восточным. Лишь в северо-западной части подзоны черноземов типичных встречаются массивы черноземов выщелоченных, а на крайнем юго-востоке к югу от реки Богучар в пределах Богучарского и Кантемировского районов в сочетании с черноземами обыкновенными на площади 50 тыс. га залегают черноземы южные. На залесенных территориях развиты серые и светло-серые лесные почвы, по поймам рек – луговые почвы, торфяники[6].

В пределах каждой подзоны размещение почвенного покрова подчинено закономерностям местного характера, на размещение оказывает влияние высота местности, экспозиция склонов, неоднородность естественной растительности в прошлом и настоящем, разнообразие почвообразующих пород, неодинаковый уровень залегания и состав грунтовых вод, воздействие хозяйственной деятельности человека.

Зависимость состава почвенного покрова от высоты местности хорошо заметна при движении с Окско-Донской низменной равнины на Среднерусскую возвышенность в подзоне типичного чернозема по маршруту: Панино – Новая Усмань – Хохольский район – Нижнедевицк, где высоты увеличиваются от 140–160м до 240–270 м. Главными компонентами почвенного покрова на Окско-Донской низменности со средним относительным превышением их над поймами 10–20м являются полугидроморфные лугово-черноземные и гидроморфные черноземно-луговые почвы с комплексами осолоделых, солонцеватых, засоленных и заболоченных почв в понижениях рельефа. На Среднерусской

возвышенности в этой почвенной подзоне со средним относительным превышением водоразделов над поймами 50–80 м доминируют автоморфные черноземы в сочетании с серыми лесостепными почвами и черноземами выщелоченными. На высотах 240–270 м господствуют черноземы выщелоченные среднемощные среднегумусные, на высотах 190–240 м – черноземы типичные среднемощные и мощные среднегумусные. На возвышенностях сложность почвенного покрова усиливается густой расчлененностью территории и связанной с ней высокой эродированностью почв на склоновом типе местности. Этот тип занимает более половины территории подзоны типичного чернозема на возвышенностях. На террасированных левобережьях Дона и Воронежа особенно в Рамонском, Новоусманском, Каширском и Лискинском районах проявляется меридиональная смена почв. От поймы рек Дона и Воронежа к востоку происходит постепенное повышение местности и вслед за ней смена почвенного покрова. На самых низинных участках – в поймах рек сформировались аллювиальные дерновые, аллювиальные луговые, лугово-болотные и пойменно-лесные почвы разной степени заболоченности. Первая и вторая надпойменные террасы покрыты песками и супесями с преобладанием дерново-лесных и серых лесных почв легкого гранулометрического состава. Третья надпойменная терраса прикрыта лессовидными суглинками, которые сменяются лугово-черноземными почвами и черноземами выщелоченными и типичными суглинистыми. Здесь почвы отличаются низким плодородием, подвержены водной и ветровой эрозии на необлесенных пространствах [5,6].

Относительно дренированная окраинная часть водораздела у третьей террасы прикрыта черноземами тяжелосуглинистыми. Они широкой полосой (3–5 км) окружают междуречные недренированные пространства Окско-Донской равнины с лугово-черноземными и черноземно-луговыми мощными глинистыми почвами. Далее к востоку и юго-востоку по мере повышения и

усиления дренированности, гидроморфные почвы сменяются черноземами типичными средне-мощными среднегумусными.

На восточном склоне Среднерусской возвышенности в пределах Воронежской области климат более сухой и континентальный. Поэтому здесь меньше выщелоченность почв. Территория, расположенная на восточном склоне Среднерусской и севере Калачской возвышенностей (Репьевский, части Нижнедевицкого, Семилукского, Хохольского, Острогожского, Бобровского, Бутурлиновского, Таловского, Терновского, Грибановского, Борисоглебского районов), покрыта преимущественно черноземами типичными среднемощными среднегумусными, реже малогумусными тяжелосуглинистыми и глинистыми.

Южную часть области занимает подзона сплошного распространения черноземов обыкновенных. С севера она ограничена подзоной типичных черноземов, на юге выходит за пределы области, включает Ольховатский, Россошанский, Каменский, Подгоренский, Верхнемамонский, Калачеевский, Петропавловский, Богучарский, Кантемировский, а также южные части Острогожского, Лискинского, Бобровского, Бутурлиновского, Поворинского районов. На севере в пределы подзоны вклиниваются массивы черноземов типичных, на крайнем юго-востоке появляются черноземы южные (в Богучарском и Кантемировском районах) [341].

Следует обратить внимание, что в последнее время происходит резкое ухудшение агрохимических, агрофизических и биологических свойств черноземов. В основном преобладают средне- и малогумусные почвы, снижается поступление органического вещества, повышается минерализация гумуса. В последние годы отмечено снижение поступления подвижных форм фосфора, увеличивается процент почв с повышенной кислотностью [155].

В связи с этим, следует отметить, что почвы Воронежской области нуждаются в повышении плодородия, хотя и остаются по-прежнему одними из самых плодородных.

Таким образом, Центрально-Черноземный регион (Воронежская область), имеет достаточно благоприятные почвенно-климатические условия для производства и возделывания сельскохозяйственных культур. Но для повышения их урожайности необходимо использование современных методов и технологий, увеличение доли органических удобрений, обогащающих почву необходимыми питательными веществами.

2.2 Метеорологические условия в годы проведения исследований

Полевые опыты проводили в годы, различающиеся по метеорологическим условиям. По данным Росгидромета за 2011 – 2015гг. они имели характерные особенности и отклонения от усредненных многолетних данных (табл.2.1– 2.4).

Весенний период 2011–2015гг. в Белгородской области характеризуется теплой погодой, отклонения от средней месячной температуры наблюдаются практически только в сторону её повышения (табл.2.1). Исключение – апрель 2011г., 2015г. Самая низкая температура воздуха в 2011г. была 1 апреля ($-1,6^{\circ}\text{C}$), самая высокая – 31 мая ($+29,6^{\circ}\text{C}$), в 2012г. – самая низкая температура воздуха отмечена 2 апреля ($-1,0^{\circ}\text{C}$), самая высокая – 12 мая ($+32,0^{\circ}\text{C}$). В 2013г. самые низкие температуры наблюдались 9-го апреля ($+0,4^{\circ}\text{C}$). В этом же году 15 мая был отмечен высокий температурный порог – ($+30,4^{\circ}\text{C}$).

Наименьшее количество осадков в Белгородской области наблюдалось в апреле 2013 года, что составило от нормы 24%.

Лето в Белгородской области за рассматриваемый период было достаточно теплым. В 2011г. самые низкие температуры пришлись на август и составили $+10,7^{\circ}\text{C}$ (26.08), самая высокая температура была зафиксирована 27 июля ($+35,7^{\circ}\text{C}$). В 2012г. самые низкие и высокие температуры были отмечены в августе – $8,0^{\circ}\text{C}$ и $+37,0^{\circ}\text{C}$ соответственно.

Таблица 2.1 Температура воздуха в период исследований в
Белгородской области

Месяц	Температура воздуха, °С						Отклонение от средней месячной, °С				
	2011 г.	2012 г.	2013 г.	2014 г.	2015 г.	Норма ср. мес.	2011 г.	2012г.	2013г.	2014г.	2015г.
Апрель	8,5	13,7	11,3	9,4	9,1	9,2	- 0,7	+4,5	+2,1	+0,2	-0,1
Май	17,9	19,8	20,4	18,9	16,1	15,6	+2,3	+4,2	+4,8	+3,3	+0,5
Июнь	21,1	21,8	22,2	18,5	21,3	19,3	+1,8	+2,5	+2,9	-0,8	+2,0
Июль	24,1	24,7	21,2	22,4	21,4	21,3	+2,8	+3,4	- 0,1	+1,1	+0,1
Август	21,1	22,0	21,1	22,1	21,6	20,3	+0,8	+1,7	+0,8	+1,8	+1,3
За период вегетации	18,5	20,4	19,2	18,3	17,9	17,1	+1,4	+3,3	+2,1	+1,2	+0,8

В 2013г. наиболее холодные дни были отмечены в июле (+10,7⁰С), самые жаркие – в июне и августе (+ 33,4⁰С). Самый холодный день лета 2014г. пришелся на июнь: 19 июня температура составила +8,6⁰С, самый теплый день отмечен в августе (+36,5⁰С). Летом 2015г. самый холодный день отмечен в августе (26.08.) – +9,3⁰С, самый теплый – в июле (27.07) – +36,2⁰С.

Наиболее влажным в Белгородской области было лето 2011г. Количество выпавших осадков превысило норму и составило 200 – 215%. Июнь и июль 2012г. были достаточно сухими. Лето 2013, 2014 и 2015гг. можно отметить как более комфортное в сравнении с предыдущими, за исключением августа 2015г., когда количество выпавших осадков составило от месячной нормы лишь 5% (табл.2.2).

Весна в Воронежской области в период исследования была вполне комфортной, за исключением апреля 2014 г.: 2 апреля температура снизилась до (-)4,2⁰С. Хотя отклонение от нормы среднемесячной температуры для этого месяца в 2014г. было положительным. Самая высокая температура в апреле отмечена в 2012 г., 29.04 она составила +29,2⁰С. Май 2011– 2015гг. был по температурному режиму теплее средней месячной нормы. Самым

жарким можно считать май 2014 г., температура воздуха 25 мая поднялась до +32,6⁰С (табл.2.3).

Таблица 2.2 Сумма атмосферных осадков в период исследований в Белгородской области

Месяц	Сумма осадков, мм						Отклонение от средней месячной, мм				
	2011 г.	2012 г.	2013 г.	2014 г.	2015 г.	Норма за месяц	2011 г.	2012 г.	2013 г.	2014 г.	2015 г.
Апрель	48	11	8	39	61	34	+14	-23	-26	+5	+27
Май	28	48	41	55	34	50	-22	-2	-9	+5	-16
Июнь	122	33	38	137	72	61	+61	-28	-23	+76	+11
Июль	131	19	84	41	107	61	+70	-42	+23	-20	+46
Август	11	89	51	46	2	43	-32	+46	+8	+3	-41
За период вегетации	68	40	44,4	63,6	55,2	49,8	+18,2	-9,8	-5,4	+13,8	+5,4

Таблица 2.3 Температура воздуха в период исследований в Воронежской области

Месяц	Температура воздуха, ⁰ С						Отклонение от средней месячной, ⁰ С				
	2011 г.	2012 г.	2013 г.	2014 г.	2015 г.	Норма ср. мес.	2011 г.	2012г.	2013г.	2014г.	2015г.
Апрель	7,3	11,9	9,7	8,8	8,1	8,3	- 1,0	+3,6	+1,4	+0,5	-0,2
Май	17,1	18,4	19,5	18,5	16,3	14,8	+2,3	+3,6	+4,7	+3,7	+1,5
Июнь	20,6	20,1	21,2	18,0	20,7	18,5	+2,1	+1,6	+2,7	-0,5	+2,2
Июль	23,7	22,1	20,1	22,3	21,1	20,5	+3,2	+1,6	- 0,4	+1,8	+0,6
Август	20,2	20,3	20,4	21,8	19,8	19,2	+1,0	+1,1	+1,2	+2,6	+0,6
За период вегетации	17,8	14,7	18,2	17,9	17,2	16,3	+1,5	+2,3	+1,9	+1,6	+0,9

Наименьшее количество осадков пришлось на апрель 2013 года и май 2012, 2015 гг. Этот период характеризовался аномальной жарой. В апреле 2013 г. сумма выпавших осадков от нормы составила всего 32%. (табл.2.4), в то время как май 2013 г. превысил норму на 39%.

Таблица 2.4 Сумма атмосферных осадков в период исследований
в Воронежской области

Месяц	Сумма осадков, мм						Отклонение от средней месячной, мм				
	2011 г.	2012 г.	2013 г.	2014 г.	2015 г.	Норма за месяц	2011 г.	2012 г.	2013 г.	2014 г.	2015 г.
Апрель	26	72	12	32	62	38	-12	+34	- 26	- 6	+24
Май	26	21	64	42	24	46	-20	- 25	+18	- 4	-22
Июнь	65	184	18	99	73	74	-9	+110	-56	+25	-1
Июль	47	64	83	2	69	62	-15	+2	+21	-60	+7
Август	97	186	86	47	30	52	+45	+134	+34	-5	-22
За период вегетации	52,2	105,4	52,6	44,4	51,6	54,4	-2,2	+51	-1,8	-10	-2,8

Лето 2011 -2015 гг. можно отметить как достаточно теплый период с незначительным отклонением от средней месячной температуры. Самая низкая температура наблюдалась в августе 2015 г. – (+6,2⁰C), самая высокая – в августе 2014 г. – (+ 37,5⁰ C). Наиболее влажными оказались июнь и август 2012 г. Так в августе этого года выпало 186 мм осадков, что составило от нормы 358% (табл.2.4). Самыми засушливыми были июнь 2013 г. и июль 2014 г. В июне 2013 г. выпало всего 18 мм осадков, что составило от нормы лишь 24%. В июле 2014 г. выпало всего лишь 2 мм осадков, что составило от нормы только 3 %.

В целом в 2011– 2015 гг. почва была хорошо увлажнена, отклонение от нормы было незначительным за исключением 2012 г. и 2014 г.

На рисунке 2.1 представлены значения усредненных температур в Центрально-Черноземном регионе за период 2011 – 2015 гг. Анализ этих данных позволяет сделать следующие выводы. В целом в Центральном Черноземье за рассматриваемый период колебания температур были незначительными.

Анализ усредненных значений количества выпавших осадков за рассматриваемый период (рис.2.2) показывает, что в регионе самыми сухими были апрель 2013 г., май 2012 и 2015 гг., июнь 2013 г., июль 2014 г. и август

2014 и 2015 гг.. Больше всего осадков выпало в июне 2012 и 2014 гг., июле 2011г. и августе 2011 и 2012 гг..

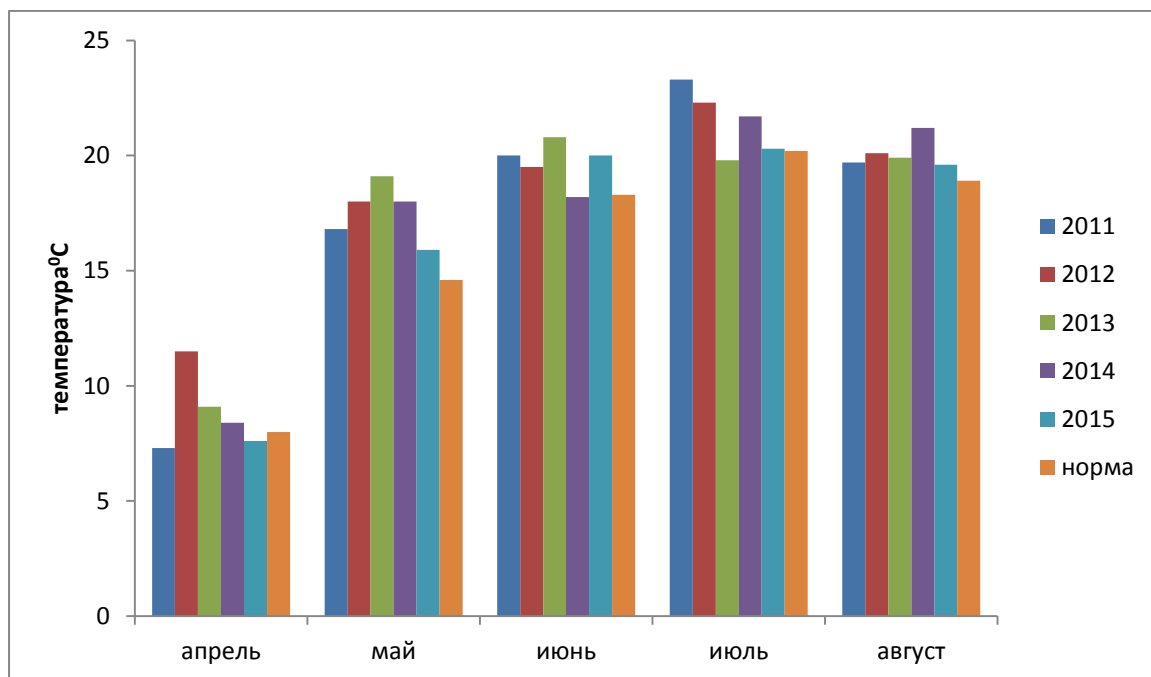


Рисунок 2.1 Среднее значение температуры в Центральном-Черноземном регионе за период 2011–2015 гг.

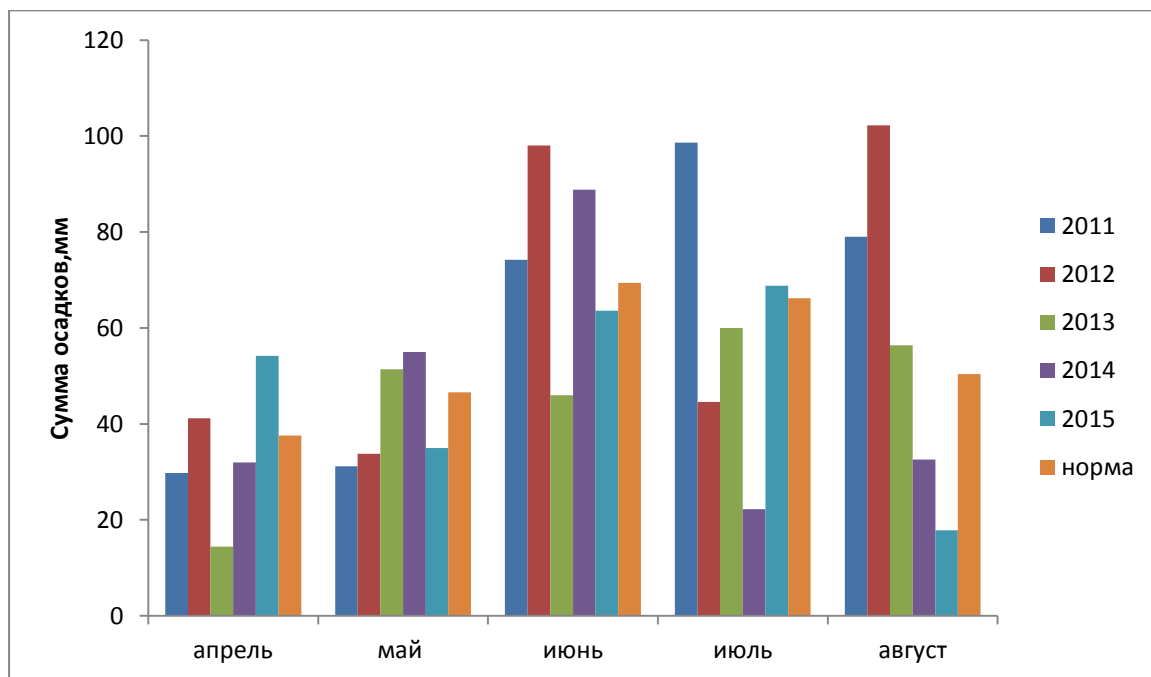


Рисунок 2.2 Среднее количество осадков в Центральном-Черноземном регионе за период 2011–2015 гг.

Таким образом, проведенный анализ почвенно-климатических и метеорологических условий в 2011 – 2015 гг., показывает, что для проведения эксперимента условия в регионе были вполне благоприятными.

2.3 Объекты исследования

Объектами исследования были:

- сточные воды, полученные с очистных сооружений ОАО «Воронежский мясокомбинат», ОАО «Алексеевский мясоптицекомбинат»;
- биоресурсы, используемые для очистки сточных вод;
- осадок сточных вод, полученный после очистки стоков культурой *Str. chromogenes s.g. 0832* ;
- культура рапса ярового «Ратник».

Основными объектами исследований служили чистые культуры актиномицетов, принадлежащие различным таксономическим группам. Микроорганизмы были получены во ВНИИ антибиотиков (г. Москва), ВНИТИАФ (г.С.-Петербург), Всесоюзной коллекции микроорганизмов (г. Москва).

Культуры микроорганизмов поддерживали на средах, рекомендованных ВНИИА, ВНИТИАФ, ВКМ. Их выращивали в термостате в течение 12 суток при 29–30°C. Для подбора продуцента кератинрасщепляющей протеиназы использовали питательную среду [86,87], которая имела следующий состав (г/дм³): картофельный крахмал – 40; соевая мука – 10; (NH₄)₂SO₄ – 0,65; KН₂PО₄ – 0,45; Zn SO₄ – 0,02; Fe SO₄– 0,01; MnCl₂– 0,01; СаСО₃ – 3,0; водопроводная вода; рН среды 6,70– 6,80. Во все среды вносили 0,5% измельченного куриного пера в качестве источника кератина. Перо предварительно обезжиривали хлороформом, промывали, высушивали. Культивирование проводили в глубинных условиях в колбах объемом 750 см³, содержащих 100 см³ среды, при 28 – 30°C на лабораторной качалке с частотой вращения $n = 220\text{--}240$ об/мин в течение 120 часов.

Питательную среду засевали 5% по объему посевного материала, которым служила 48-часовая культура, выращенная глубинно на среде [86] (г/дм³): картофельный крахмал – 20; соевая мука – 20; KH_2PO_4 – 0,5; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 3,0; NaCl – 2,5; CaCO_3 – 3,0; водопроводная вода; pH среды 6,65 – 6,70. Условия культивирования те же, что и при основном выращивании.

При изучении влияния источников азота на биосинтез кератинрасщепляющей протеиназы *Str. chromogenes* s.g. 0832, их вносили в концентрации 0,2% по азоту (для неорганических соединений) и в количестве 1% по весу (для органических соединений азота). Источники углерода вносили в количестве 2% по углероду. Контролем во всех опытах была минеральная среда Чапека, где в качестве источника углерода использовали картофельный крахмал, источником азота служил NaNO_3 .

2.4 Методика исследований

Экспериментальная работа проводилась в течение 2011 – 2015 годов. Почва опытного участка – чернозем выщелоченный, среднесиловый, малогумусный, тяжелосуглинистый на лесовидном суглинке с содержанием гумуса 3,7 – 3,8 % (0-20 см), pH – 5,0 – 5,2, гидролитическая кислотность – 3,20 – 3,35 мг-экв на 100 г почвы. Содержание подвижного фосфора – 100–105мг/кг, обменного калия – 105–128мг/кг[97]. Полевые опыты проводились в крестьянском фермерском хозяйстве «Зенит» Каширского района Воронежской области. Площадь учетных делянок – 10м², повторность четырехкратная, размещение вариантов систематическое. Наблюдения и анализы проводились согласно методики полевого опыта Б.А. Доспехова [89]. Уборку урожая осуществляли вручную с последующим взвешиванием и определением качества полученного продукта.

В исследованиях применялись общепринятые в агроэкологии методы закладки и проведения опытов [83,89].

2.5 Оценка безотходности производств мясной промышленности

Оценка безотходности производств мясной промышленности по эффективности использования водных ресурсов проводилась по методикам, предложенными Н.Г. Копейкиной [122], Т.С. Титовой [213], В.И. Комаровым с соавторами [119,120], с учетом особенностей рассматриваемых производств.

Принято считать, что общим критерием экологической безопасности технологического процесса является минимизация его воздействия на окружающую среду. В качестве такого критерия предложен уровень безотходности K_6 – интегральный показатель, учитывающий масштабы потребления природно-сырьевых ресурсов, объемы производимой продукции, массу размещаемых в окружающей среде отходов и степень их опасности. Он формируется из двух элементарных составляющих: K_m – показателя полноты использования материально-сырьевых ресурсов, характеризующего степень замкнутости технологического процесса на «входе» и «выходе» по отношению к окружающей среде; $K_{э. общ.}$ – показателя экологичности, характеризующего интенсивность воздействия процесса на окружающую среду [97]:

$$K_6 = f(K_m; K_{э. общ.}). \quad (2.1)$$

Величина коэффициента безотходности K_6 и его составляющих может изменяться от 0 до 1, то есть $0 \leq K_6 \leq 1$. Значение $K_6 = 0$ соответствует нанесению максимального вреда окружающей среде, соответственно $K_6 = 1$ свидетельствует об отсутствии отрицательного воздействия на окружающую среду при использовании определенной технологии. При этом возможны следующие случаи:

$K_m < 1$; $K_{э. общ.} > 1$ – технология, производство не соответствует экологическим требованиям;

$K_m \geq 1$; $K_{э. общ.} \leq 1$ – технология, производство соответствует экологическим требованиям.

Предложенная методика оценки экологичности технологий, производств была адаптирована к предприятиям мясной отрасли, при этом в качестве показателя K_m оценивали полноту использования водных ресурсов. Расчет проводили по формуле:

$$K_m = (Q - V) / Q, \quad (2.2)$$

где Q – фактический расход сырья, материалов, энергии на единицу производимой продукции; V – объем неиспользуемых отходов.

В данной работе за показатель Q брали расход потребляемой свежей воды на 1 т выпускаемой продукции, m^3/t ; V – объем сбрасываемых сточных вод, m^3/t . Тогда K_m будет характеризовать полноту использования водных ресурсов в технологическом процессе.

Коэффициент экологичности, характеризующий степень безопасности производства по отношению к окружающей среде, должен учитывать качественный и количественный состав сточных вод и допустимые значения по каждому загрязняющему веществу (ПДС). Расчет данного показателя проводили по формуле:

$$K_{\Sigma} = K_{\text{факт}} / \text{ПДС}, \quad (2.3)$$

где $K_{\text{факт}}$ – фактическое количество загрязняющих веществ, находящихся в сточных водах, mg/dm^3 ; ПДС – предельно допустимая концентрация сброса каждого вида загрязняющего вещества mg/dm^3 . Общий коэффициент экологичности определялся как среднеарифметическое по формуле:

$$K_{\Sigma, \text{общ}} = \sum_{i=1}^i K_{\Sigma i} / n, \quad (2.4)$$

где n – количество загрязняющих веществ в стоке.

При этом возможны два случая:

если $K_{\Sigma, \text{общ}} \leq 1$, то производство полностью соответствует экологическим требованиям, т.е. фактическое загрязнение сточными водами не превышает ПДС,

если $K_{\Sigma, \text{общ}} > 1$, то производство не соответствует экологическим требованиям, т.к. сбросы превышают допустимый уровень.

Таким образом, условно можно принять, что производство считается безотходным при $K_m = 1$ и $K_{э.общ.} \leq 1$, малоотходным – при $0,5 \leq K_m < 1$ и $K_{э.общ.} \leq 1$ и опасным для окружающей среды при $K_m < 0,5$ и $K_{э.общ.} > 1$.

При выполнении экспериментов были использованы следующие методы исследований: определение плотности осадка проводили согласно ГОСТ 3625–84; массовой доли жира – с использованием жироскопа (ГОСТ 5867–90) и рефрактометрически; массовую долю сухого вещества, золы влаги – в соответствии с ГОСТ 3626–93; содержание взвешенных веществ – с помощью беззольных фильтров согласно ГОСТ 18164–92; определение массовой доли кальция, магния – методом комплексонометрического титрования; содержание аминного азота – фотометрически [146,147]; величину pH – потенциометрически на pH–метре, милливольтметре pH–150МА; определение размера флокул проводили методом светорассеяния. Аминокислотный состав осадка сточных вод определяли на автоматическом аминокислотном анализаторе ААА–Т 333 (Чехия), содержание ионов металлов – на атомно-абсорбционном спектрофотометре С–115М.

Протеолитическую активность (ПА) определяли по ГОСТ 20264.2–88 [77]. За единицу ПА принимали такое количество фермента, которое за 1 мин при 30° катализировало переход в неосаждаемое трихлоруксусной кислотой состояние количество казеината натрия, содержащее 1 микромоль тирозина (1 микромоль тирозина равен 0,181 мг).

Определение кератинолитической активности (КА) проводили по Кашкину с соавторами [97,98]. За единицу КА принимали то количество фермента, которое в результате протеолиза 200 мг кератина при 37°С в течение 3 часов в присутствии 5 см³ 0,1М боратного буфера (pH 9,0), 0,5 см³ · 10⁻³ М хлорида магния и дистиллированной воды (для доведения объема до 10 см³) давало превышение оптической плотности опытных проб над контрольными, равное 0,1 при измерении на спектрофотометре с длиной волны 280 нм.

Содержание белка в исследуемом объекте определяли по [103].

Электрофорез проводили по методу Дэвиса [257].

Эффективность флокулирующего действия (D) при внесении культуральной жидкости микроорганизма *Str. chromogenes* 0832 в сточную воду определяли после флокуляции в течение 1 часа на ФЭК – 56М при 540 нм по формуле:

$$D = (n_0 - n) / n, \quad (2.5)$$

где n_0 – оптическая плотность исходной сточной воды, n – оптическая плотность сточной воды после флокуляции [143].

Определение состава гидролизата проводили по [56]. 20 см³ гидролизата отбирают в стаканы емкостью 50 см³, вносят 10 см³ 60%-ной трихлоруксусной кислоты для осаждения негидролизированных белков. Через 20 минут выпавшие в осадок белки отфильтровывают на бумажном фильтре, промывают 10 см³ 5%-ной трихлоруксусной кислотой. Полученный фильтрат используют для определения суммы пептидов и аминокислот.

Осадок белка, оставшийся на фильтре, растворяют 0,1н раствором NaOH, конечный объем – 25 см³. Аликвотную часть белкового раствора (10 см³) используют для проведения биуретовой реакции: к 10 см³ раствора добавляют 3 см³ 17% KOH, 2 см³ 20% CuSO₄ и объемы проб доводят до 25 см³ 5% KOH. После тщательного перемешивания смесь центрифугируют при 3000 об/мин в течение 10 минут или фильтруют. Оптическую плотность надосадочной жидкости определяют при 570–580 нм на фотоэлектроколориметре.

В фильтрат, полученный после осаждения белков, вносят 1 см³ концентрированной H₂SO₄ и 6 см³ 25% раствора фосфорновольфрамной кислоты. Выпавший через 24 ч осадок пептидов отфильтровывают на бумажном фильтре и промывают 15 см³ 5% H₂SO₄. Фильтраты используют для определения содержания суммы свободных аминокислот.

Осадок пептидов растворяют 0,1 н NaOH. Конечный объем – 25 см³. К 10 см³ раствора добавляют 3 см³ 17% KOH, 2 см³ 20% CuSO₄ и объем доводят до 25 см³ 5% KOH. После тщательного перемешивания смесь

центрифугируют при 3000 об/мин в течение 10 минут или фильтруют. Оптическую плотность надосадочной жидкости определяют при 570–580 нм на фотоэлектроколориметре.

Расчет содержания пептидов и белков проводят по формуле:

$$X = (D \cdot 100) / (2,65 \cdot a), \% \quad (2.6)$$

где X – содержание белков (пептидов) в 20 см^3 гидролизата; D – оптическая плотность; a – количество исследуемой смеси.

Из 50 см^3 фильтрата, полученного после осаждения пептидов, отбирают пробы по $2,5 \text{ см}^3$, доводят рН в них до 6,5 – 7,0 1 н раствором NaOH. Затем объем проб доводят до 5 см^3 дистиллированной водой. К 1 см^3 нейтрализованного фильтрата приливают $0,5 \text{ см}^3$ нингидрированного реактива, приготовленного на монометиловом эфире этиленгликоля с добавлением хлористого олова. Нингидрированную реакцию проводят в пробирках на кипящей водяной бане в течение 20 минут. Объем пробы доводят до 10 см^3 дистиллированной водой. Оптическую плотность определяют при 570 нм на ФЭК.

Содержание суммы аминокислот рассчитывают по формуле:

$$X = (27,9 \cdot D) \cdot 100 / a, \% \quad (2.7)$$

где D – оптическая плотность; a – количество исследуемой смеси.

Скорость осаждения грубодисперсных веществ определяли в цилиндре Лисенко вместимостью 100 см^3 с ценой деления 1 см^3 . Наполняли цилиндр до метки исследуемой сточной водой, тщательно перемешивали и через 1 и 2 часа измеряли объем выпавшего осадка. Результат выражали в процентах к объему сточной воды [147].

Определение каждой пробы производили в трех или четырех повторностях при хорошей сходимости. Данные таблиц и рисунков представляют среднее из трех или четырех определений. Достоверность полученных экспериментальных данных проверяли с помощью пакета «Анализ данных» Microsoft Excel.

3 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПО ВЫБОРУ АКТИНОМИЦЕТА-ДЕСТРУКТОРА ТРУДНОРАЗЛАГАЕМЫХ БЕЛКОВ СТОЧНЫХ ВОД

3.1 Выбор продуцента ферментов, специфичных к белкам сточных вод предприятий мясной промышленности

Биологическая очистка сточных вод происходит при участии большого разнообразия организмов: бактерии, в том числе и актиномицеты, грибы, водоросли, простейшие, многоклеточные. Но её качество зависит от условий, которые будут созданы для этих организмов, входящих в биологический консорциум сточных вод. Для повышения эффективности очистки стоков необходимо точно знать физико-химический и микробиологический состав сточных вод. Эта информация позволит грамотно подойти к селекции микроорганизмов, которые первыми приступают к трансформации и разложению органических веществ. Управлять этими процессами можно непосредственно затрагивая тонкие механизмы физиологии и биохимии микроорганизмов. Развитие этого направления дает возможность рационально и научно обоснованно регулировать активность микрофлоры и интенсифицировать процесс биологической очистки сточных вод. Следует обратить внимание на тот факт, что до настоящего времени состав отдельных видов микроорганизмов полностью не изучен. Поэтому эффективность какого-либо организма, в том числе и актиномицетов, очень сложно определить. Требуются дополнительные исследования по данной проблеме.

Исследования, обобщенные в работах П. И. Гвоздяк [72], Л.В.Брындиной [54,55], М.Н. Ротмистрова [194], а также опубликованные за рубежом (Deng S.B. [258]), свидетельствуют о перспективности именно этого направления.

В связи с необходимостью разработки эффективной технологии очистки промышленных сточных вод внимание исследователей все больше привлекают поиски возможности использования чистых культур микроорганизмов, способных трансформировать трудноразлагаемые органические соединения. Достоинство чистых культур специфических деструкторов еще и в том, что они могут быть использованы в иммобилизованном виде на адсорбентах и биофильтрах для предотвращения отравления активного ила при залповых сбросах и при введении в строй новых технологических схем, когда состав сточных вод резко меняется.

Литературные данные позволяют выделить несколько этапов осуществления микробиологического метода очистки отработанных вод промышленных предприятий: 1) выделение активных штаммов микроорганизмов-деструкторов; 2) усиление специфической активности путем адаптации к повышенным концентрациям загрязнителей; 3) проверка жизнеспособности микроорганизмов в определенных условиях; 4) проверка устойчивости или возможности трансформации других компонентов сточных вод; 5) разработка технологии применения штаммов-деструкторов в очистных сооружениях; 6) устранение факторов, ингибирующих процесс биологической очистки.

В отработанных технологических жидкостях мясокомбинатов содержится большое количество фибриллярных белков (коллаген, кератин и др.), которые отличаются низкой функциональностью: нерастворимы в воде, имеют низкую влагоудерживающую способность, очень высокую механическую прочность. Эта особенность объясняется наличием большого числа поперечных дисульфидных связей между полипептидными цепями в структуре таких белков [30,127,261,262]. В связи с этим при выборе микроорганизма-деструктора фибриллярных белков руководствовались наличием у него протеолитической активности, в том числе кератиназной (последняя необходима для гидролиза белков кератинов, которые практически не разрушаются в обычных условиях) [34,35,144,326,328,329].

С целью выявления активного продуцента кератинрасщепляющей протеиназы нами были проверены некоторые актиномицеты различных таксономических групп. У 50 штаммов микроорганизмов, взятых для исследования, одновременно определяли протеолитическую активность (ПА) и кератиназную активность (КА). Протеолитическую активность определяли по ГОСТ 20264.2–88 [77]. Определение кератиназной активности проводили по Кашкину [113,114]. Поверхностные культуры сравниваемых микроорганизмов поддерживали на средах, рекомендованных Всероссийской Коллекцией микроорганизмов (ВКМ), научно-исследовательским институтом антибиотиков и ферментов (г. С-Петербург ВНИТИАФ). Культуры выращивали в термостате при 30⁰С, в течение 12 суток. В качестве посевного материала использовали 48-часовую культуру, выращенную на среде (г /дм³): картофельный крахмал – 20; соевая мука – 20; (NH₄)₂SO₄ – 3,0; CaCO₃ – 3,0; KН₂PO₄ – 0,5; NaCl – 2,5; рН среды 6,65. Культивирование проводили в глубинных условиях в колбах объемом 750 см³, содержащих 100 см³ среды, при 28-30⁰С на качалке (220–240 об/мин). Основную питательную среду состава (г/дм³): картофельный крахмал – 40; соевая мука – 10; измельченное перо – 5; (NH₄)₂SO₄ – 0,65; KН₂PO₄ – 0,45; FeSO₄ – 0,01; ZnSO₄ – 0,02; MnCl₂ – 0,01; CaCO₃ – 3,0, засеивали 5% по объему посевного материала и выращивали на качалке 120 часов при рН среды 6,80. Культуральную жидкость актиномицетов вносили в количестве 3 % к объему сточной воды, перемешивали в течение 15 минут, отстаивали в течение часа. После чего определяли флокулирующий эффект (Д). Данные по выбору продуцента кератинрасщепляющей протеиназы представлены в таблице 3.1.

Таблица 3.1 Сравнительная характеристика биосинтетической способности некоторых актиномицетов

№№ п/п	Наименование культуры	ПА, ед/см ³	КА, ед/см ³	флокулирующий эффект (Д)
1	2	3	4	5
1	<i>Str. chromogenes subsp. graecus</i> 0832	2,204	3,000	1,22
2	<i>Str. californicus</i> 1015	0,133	2,600	0,98
3	<i>Str. flavovariabilis</i> BKM Ac-141	0,187	2,100	0,72
4	<i>Str. diastatochromogenes</i> ВНИИА 1350	0,044	2,100	0,64
5	<i>Str. kurssanovii</i> BKM Ac-715	0,036	1,600	0,57
6	<i>Str. sp. (S. scabies)</i> BKM Ac-841	0,213	1,200	0,51
7	<i>Str. fradiroseus</i> BKM Ac-155	0,217	0,800	0,49
8	<i>Str. fradiae</i> ЛИАИ 0050	0,024	0,713	0,45
9	<i>Str. autotrophica</i> BKM Ac-759	0,720	0,600	0,54
10	<i>Str. viridochromogenes</i> 58	0,036	0,600	0,33
11	<i>Str. fradiae</i> BKM Ac-764	0,020	0,500	0,33
12	<i>Str. bikiniensis</i> BKM Ac-999	1,040	0,100	0,50
13	<i>Str. viridochromogenes</i> ЛИАИ 0038	0,383	0,100	0,38
14	<i>Str. chromofuscus</i> 6050	0,250	0,084	0,35
15	<i>Str. hygroscopicus</i> ЛИАИ 0374	0,784	0,060	0,42
16	<i>Str. vulvoviridis</i> BKM Ac-161	0,173	0,060	0,35
17	<i>Str. olivoviridis</i> ВНИИА 1258	0,089	0,050	0,20
18	<i>Str. firidochromogenes</i> BKM Ac-629	2,500	0,040	0,88
19	<i>Str. hugroscopicus</i> BKM Ac-831	0,175	0,040	0,35
20	<i>Str. sporotumulus</i> BKM Ac-320	0,126	0,030	0,30
21	<i>Str. fradiorectus</i> BKM Ac-154	0,078	0,030	0,25
22	<i>Str. sp. (S. sporocanensis)</i> BKM Ac-310	0,030	0,030	0,18
23	<i>Str. achromogenes</i> 391	0,251	0,027	0,36
24	<i>Str. albus</i> ЛИАИ 0012	0,047	0,025	0,20
25	<i>Str. pseudoalbus</i> BKM Ac-267	0,282	0,020	0,38
26	<i>Str. sp. (S. asterosporus)</i> BKM Ac-40	0,267	0,017	0,36
27	<i>Str. diastaticus</i> BKM Ac-723	0,080	0,016	0,30
28	<i>Str. diastatochromogenes</i> ЛИАИ 0172	0,078	0,013	0,27
29	<i>Str. griscofarillus</i> 187	0,250	0,009	0,35
30	<i>Str. coelicolor</i> ВНИИА 1173	0,070	0,008	0,20
31	<i>Str. cinereus</i> BKM Ac-84	1,451	0	0,55

Окончание таблицы 3.1

1	2	3	4	5
32	<i>Str. chromofuscus</i> ВНИИА 1191	1,191	0	0,52
33	<i>Str. olivaceoscleroticus</i> ВНИИА 1445	1,173	0	0,51
34	<i>Str. canarius</i> 1392	0,764	0	0,42
35	<i>Str. griseus</i> subsp. <i>neomycini</i> 0047	0,670	0	0,40
36	<i>Str. argenteus</i> ВКМ Ас-39	0,628	0	0,40
37	<i>Str. aureus</i> 92	0,533	0	0,40
38	<i>Str. sp. (S. aculentosporus)</i> ВКМ Ас-1	0,392	0	0,38
39	<i>Str. olivaceus</i> ВКМ Ас-254	0,266	0	0,36
40	<i>Str. achromogenes</i> 1000	0,196	0	0,33
41	<i>Str. calvus</i> ВНИИА 1103	0,196	0	0,33
42	<i>Str. flavovirens</i> ВНИИА 421	0,178	0	0,33
43	<i>Str. albus</i> ВКМ Ас-35	0,109	0	0,25
44	<i>Str. albocanus</i> ВКМ Ас-7	0,080	0	0,22
45	<i>Str. olivaceus</i> ВНИИА 519	0,080	0	0,20
46	<i>Str. sp. (S. coeliatus)</i> ВКМ Ас-105	0,064	0	0,18
47	<i>Str. olivochromofuscus</i> ВНИИА-1259	0,062	0	0,18
48	<i>Str. fragilis</i> ВНИИА 1111	0,018	0	0,12
49	<i>Str. pseudogriseolus</i> ВНИИА 1106	0	0	0,10
50	<i>Str. sp. (S. sporocaneus)</i> ВКМ Ас-311	0	0	0,08

Результаты, представленные в таблице 3.1, позволяют судить о том, что протеолитическая активность присуща большому количеству актиномицетов. Так, из 50 штаммов исследуемых микроорганизмов, 48 – обладали способностью разрушать белки в различной степени. Кератиная активность проявилась лишь у 30 штаммов из 50. Следует отметить, что между значениями протеолитической и кератиной активности нет корреляционной зависимости. Видимо, способность к продуцированию кератинрасщепляющих протеиназ является специфической особенностью отдельных представителей актиномицетов. Так 7 штаммов проявляли высокую протеолитическую активность при полном отсутствии кератиной активности.

Однако флокулирующий эффект зависит от значений протеолитической и кератиназной активности. Наилучшие показатели соответствовали наибольшим значениям ПА и КА. При этом не было установлено прямой зависимости флокулирующего эффекта конкретно от протеолитической или кератиназной активности. Он был выше у тех микроорганизмов, которые показали высокие значения гидролитической активности. Так наибольший флокулирующий эффект ($D = 1,22$) показал *Str. chromogenes subsp.graecus* 0832. При этом у него же были максимальные значения протеолитической ($2,204 \text{ ед/см}^3$) и кератиназной активности ($3,00 \text{ ед/см}^3$). На втором месте расположился *Str. californicus* 1015 с $D = 0,98$. Но у него, в отличие от *Str. chromogenes subsp.graecus* 0832, протеолитическая активность была низкой ($0,133 \text{ ед/см}^3$), а кератиназная – высокой ($2,6 \text{ ед/см}^3$). Третье место занял *Str. firidochromogenes* ВКМ Ас-629 с $D = 0,88$, который практически не показал кератиназной активности (всего $0,040 \text{ ед/см}^3$), но проявил высокую протеолитическую – $2,5 \text{ ед/см}^3$.

Отсюда можно сделать вывод, что флокулирующий эффект не связан с проявлением специфичной протеолитической или кератиназной активности, а наблюдается при наличии общей гидролитической (протеолитической) активности. Но уровень флокулирующего эффекта зависит от значения этой активности: чем она выше, тем выше эффект. Возможно, это связано с тем, что интенсивное высвобождение внеклеточных ферментов актиномицетов увеличивает количество растворимого белка в стоке, что активизирует ферментные системы и способствует более интенсивному гидролизу этих белков. В свою очередь гидролиз белков приводит к росту общего числа полярных групп, которые ориентируясь в пространстве, образуют прочный адсорбционный слой. На него сорбируется следующий и т.д. В конечном итоге повышается общий эффект флокуляции.

На основании вышеизложенного материала, для дальнейших исследований нами был выбран актиномицет *Str. chromogenes subsp.graecus* 0832.

3. 2 Влияние источников азота и углерода на биосинтез протеиназы

Str. chromogenes s.g.0832

При очистке сточных вод мясокомбинатов предполагается внесение культуры актиномицета *Str. chromogenes s.g. 0832* в стоки, которые не будут сбалансированы по составу для данного микроорганизма. Но если актиномицет предварительно будет выращен в оптимальных условиях, то это даст возможность данному микроорганизму синтезировать специфичные для белков сточных вод мясокомбинатов протеолитические ферменты, проявляющих максимальную активность. В связи с этим необходимо было определить оптимальные условия культивирования микроорганизма, т.е. выяснить влияние источников азота, углерода, других веществ на рост актиномицета и синтез им протеолитических ферментов.

При изучении влияния источников азота на биосинтез кератинрасщепляющей протеиназы *Str. chromogenes s.g. 0832*, их вносили в концентрации 0,2% по азоту (для неорганических соединений) и в количестве 1% по весу (для органических соединений азота), основываясь на результатах [99]. Контролем во всех опытах была минеральная среда Чапека ($pH_{исх}$ – 6,70–6,85), где в качестве источника углерода использовали картофельный крахмал, источником азота служил $NaNO_3$.

В качестве источников азота нами были испытаны минеральные соли $Al(NO_3)_3$, $AgNO_3$, $BaNO_3$, KNO_3 , $NaNO_3$, NH_4NO_3 , $(NH_4)_2SO_4$, $(NH_4)_2HPO_4$, $(NH_4)_2MoO_4$, NH_4Cl и органические соединения: мочевины, пептон, казеин, белково-витаминный концентрат (БВК). Было установлено (табл.3.2), что лучшими источниками минерального азота оказались NH_4NO_3 и $(NH_4)_2SO_4$. Это согласуется и с литературными данными [93]. Отмечен синтез кератинрасщепляющего фермента и на среде с $(NH_4)_2HPO_4$. На аммонийных солях $(NH_4)_2MoO_4$, NH_4Cl кератиназной активности обнаружено не было. Среди нитратных форм азота кератиназная активность проявилась только на среде с $AgNO_3$. На средах с органическими источниками азота

синтеза кератинрасщепляющей протеиназы не обнаружено за исключением среды с БВК.

Проведенные экспериментальные исследования подтверждают, что источники азота не только влияют на накопление биомассы, величину pH, но могут оказывать направленное воздействие на синтез кератинрасщепляющей протеиназы [19,67,96].

Таблица 3.2 Влияние источников азота на биосинтез протеиназы
Str. chromogenes s.g. 0832

Источники азота	pH конечное	ПА, ед/дм ³	КА, ед/дм ³	Биомасса, г/100дм ³	Удельная ПА, ед/г биомассы	Удельная КА, ед/г биомассы
Al (NO ₃) ₃	8,15	0,009	0	0,555	1,62	0
Ag NO ₃	7,70	0,004	0,60	0,534	0,75	112,42
Ba NO ₃	7,70	0,006	0	0,439	1,37	0
K NO ₃	4,85	0,003	0	0,332	0,91	0
Na NO ₃	7,35	0,009	0	0,292	3,36	0
NH₄ NO₃	7,10	0,020	3,80	0,196	10,41	1938,78
(NH₄)₂SO₄	7,25	0,013	2,95	0,275	4,73	1072,34
(NH ₄) ₂ HPO ₄	7,20	0,007	0,16	0,311	2,25	51,51
(NH ₄) ₂ MoO ₄	6,80	0,016	0	0,275	5,82	0
NH ₄ Cl	8,05	0,004	0	0,204	1,96	0
Мочевина	9,50	0,005	0	0,393	1,27	0
Пептон	9,20	0,012	0	0,409	2,93	0
Казеин	9,50	0,020	0	0,678	2,95	0
БВК	9,25	0,041	0,10	0,564	7,27	17,73
Контроль	8,30	0,006	0	0,468	1,22	0

Из источников углерода было изучено влияние арабинозы, глюкозы, мальтозы, сахарозы, картофельного и кукурузного крахмала, лимонной,

янтарной и пальмитиновой кислот, глицерина. Данные вещества вносили в количестве 2% по углероду. Контролем во всех опытах служила среда Чапека, $pH_{исх.}$ 6,70–6,5. Они оказывали разное воздействие на синтез фермента. Например, арабиноза, мальтоза, сахароза отрицательно влияли на образование протеиназы (табл. 3.3). Картофельный, кукурузный крахмал, а также лимонная кислота, напротив, способствовали биосинтезу фермента. Наибольшая продуктивность отмечена на среде с картофельным крахмалом – 1,98 ед. /г биомассы (уд. ПА) и 4,68,44 ед. /г биомассы (уд. КА).

Таблица 3.3 Влияние источников углерода на биосинтез протеиназы
Str. chromogenes subsp.graecus 0832

Источники углерода	pH кон.	ПА, ед/см ³	КА, ед/ см ³	Биомасса, г/100 см ³	Удельная ПА, ед/г биомассы	Удельная КА, ед/г биомассы
Арабиноза	6,30	0	0,00	1,987	0,00	0,00
Глюкоза	4,60	0,0030	0,00	0,623	0,48	0,00
Мальтоза	6,91	0,0000	0,00	0,681	0,00	0,00
Сахароза	6,78	0,0000	0,00	1,419	0,00	0,00
Картфельный крахмал	7,35	0,0040	0,95	0,203	1,98	468,44
Кукурузный крахмал	8,20	0,0020	1,10	0,818	0,24	134,43
Лимонная кислота	8,70	0,0070	0,40	0,422	1,66	94,81
Янтарная кислота	9,65	0,0002	0,00	1,069	0,02	0,00
Пальмит.кислота	7,55	0,0030	0,00	0,725	0,41	0,00
Глицерин	7,66	0,0020	0,00	0,565	0,35	0,00
Контроль	8,90	0,0030	0,00	0,520	0,58	0,00

Полученные результаты подтверждают литературные данные о том, что для синтеза кератинрасщепляющей протеиназы наилучшим источником углерода в большинстве случаев является картофельный крахмал [217].

Некоторыми учеными отмечалось, что введение в состав питательных сред сложных естественных продуктов, богатых органическими соединениями, оказывает положительное влияние на биосинтез ферментов, в

том числе и на кератиназу [125,243]. Например, введение соевой муки, входящей в состав питательной среды для глубинного культивирования *Actinomyces fradiae*, повышало биосинтез протеолитических ферментов в 40-50 раз. Так как, в последнее время соевая мука интенсивно применяется в мясоперерабатывающей промышленности, и её остатки могут содержаться в сточных водах предприятий отрасли, то было изучено влияние соевой муки на биосинтез ферментов *Str. chromogenes* s.g. 0832. Соевую муку вносили в количестве 1% по весу в среду с величиной $pH_{исх}$ 6,70–6,85. Контрольное выращивание осуществляли на среде Чапека.

Таблица 3.4 Синтез кератинрасщепляющей протеиназы
Str. chromogenes s.g. 0832 на среде с соевой мукой

Вариант эксперимента	pH кон.	ПА, ед/ см ³	КА, ед/ см ³	Биомасса, г/100 см ³	Удельная ПА, ед/г биомассы	Удельная КА, ед/г биомассы
Соевая мука	9,30	0,092	0,59	0,615	14,96	95,92
контроль	8,75	0,004	0,00	0,554	0,72	0,00

Результаты эксперимента позволяют судить о том, что биосинтез ферментов *Str. chromogenes* s.g. 0832 активизируется при добавлении в питательную среду соевой муки. Протеолитическая активность повысилась в 23 раза по сравнению с контролем. Можно утверждать, что для проявления актиномицетом *Str. chromogenes* s.g. 0832 кератиназной активности соевая мука выступает индуктором, так как на контрольной среде данный вид активности микроорганизм не проявлял совсем.

По литературным данным в большинстве случаев кератиназа синтезируется на средах с кератиновыми белками [295,297,328]. Поэтому было интересно выяснить, оказывают ли стимулирующий эффект на биосинтез фермента *Str. chromogenes* s.g. 0832 коровий волос, рог и перо. Рассматриваемые продукты содержат белки, относящиеся к классу кератиновых. Культивирование проводили на среде состава (г/дм³): картофельный крахмал – 40; соевая мука – 10; $NH_4 NO_3$ – 0,65; $(NH_4)_2SO_4$ –

0,65; KH_2PO_4 – 0,45; FeSO_4 – 0,01; ZnSO_4 – 0,02; MnCl_2 – 0,01; CaCO_3 – 3,0, а также с добавлением в количестве 1% по весу волоса, рога, пера при значении $\text{pH}_{\text{исх}}$ 6,70–6,85.

Результаты опыта, представленные в таблице 3.5, подтверждают предположение зарубежных ученых о положительном влиянии кератина на синтез кератинолитического фермента [295,297]. При введении данных продуктов в состав питательной среды *Str. chromogenes* s.g. 0832 кератиназная активность повысилась соответственно в 4,8 раза (волос), в 10,4 раза (рог), в 12 раз (перо), по сравнению с контрольной средой. Однако следует обратить внимание на то, что значение удельной активности (ПА, КА) на среде с пером выше других. Это позволяет сделать вывод о специфичности *Str. chromogenes* s.g. 0832 к кератину пера.

Таблица 3.5 Влияние веществ, содержащих кератиновые белки, на биосинтез кератинасщепляющей протеиназы *Str. chromogenes* s.g. 0832

Среда культивирования	pH кон.	ПА, ед/ см^3	КА, ед/ см^3	Биомасса, г/100 см^3	Удельная ПА, ед/г биомассы	Удельная КА, ед/г биомассы
Контроль	7,00	1,631	0,25	3,367	0,48	0,07
Коровий волос	7,85	0,941	1,20	1,753	0,54	0,69
Рог	8,40	1,349	2,60	2,132	0,63	1,22
Перо	6,80	2,165	3,00	0,922	2,35	3,25

На основании результатов проведенных исследований для выращивания *Str. chromogenes subsp. graecus* 0832 была выбрана среда следующего состава (г/дм³): картофельный крахмал – 40; соевая мука – 10; перо измельченное – 5; NH_4NO_3 – 0,65; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,65; KH_2PO_4 – 0,45; FeSO_4 – 0,01; ZnSO_4 – 0,02; MnCl_2 – 0,01; CaCO_3 – 3,0; $\text{pH}_{\text{исх}}$ 6,75; ПА=2,17–2,20 ед/см³; КА= 2,9–3,0 ед/ см^3 . Полученный экспериментально состав питательной среды был рассмотрен как базовый для выбора оптимальных концентраций компонентов среды.

3.3 Оптимизация питательной среды для актиномицета

Str. chromogenes s.g. 0832

При подборе оптимальных концентраций компонентов среды для культивирования *Str. chromogenes subsp.graecus* 0832 применяли математический метод планирования эксперимента [60]. Математическое описание данного процесса может быть получено эмпирически. При этом его математическая модель имеет вид уравнения регрессии, найденного статистическими методами на основе эксперимента. Так как в состав исходной среды входит 10 компонентов, то провести анализ влияния всех этих факторов на биосинтез ферментов очень сложно. Эту задачу упростили, разбив ее на несколько этапов.

1 этап.

В качестве факторов, влияющих на рост микроорганизма и биосинтез ферментов, были выбраны

X_1 – картофельный крахмал,

X_2 – соевая мука,

X_3 – измельченное перо.

Концентрация остальных компонентов среды оставалась без изменения на основном уровне. Пределы изменения исследуемых факторов приведены в таблице 3.6.

Таблица 3.6 Пределы изменения факторов

Факторы	X_1 , %	X_2 , %	X_3 , %
Основной уровень	4	1,0	0,5
Интервал варьирования	1	0,5	0,5
Верхний уровень	5	1,5	1,0
Нижний уровень	3	0,5	0

Программа исследования была заложена в матрицу планирования эксперимента (табл. 3.7).

Таблица 3.7 Матрица планирования и результаты эксперимента

№ сре ды	X ₁ , картофель ный крахмал %	X ₂ , соев ая мук а, %	X ₃ , пе ро %	Активность ферментативная ед/ см ³ (Y)		обозначе ние строк в матрице	Коэффициенты регрессии, b _i	
				протеи наза	керати наза		протеи наза	керати наза
1	3	0,5	0	0,704	0,533	X ₀	1,076	3,019
2	5	0,5	0	0,743	1,483	X ₁	0,208	0,200
3	3	1,5	0	0,255	4,300	X ₂	0,691	0,901
4	5	1,5	0	0,407	2,220	X ₁ X ₂	-0,068	-0,968
5	3	0,5	1	2,277	1,367	X ₃	0,549	1,018
6	5	0,5	1	3,344	5,090	X ₁ X ₃	0,161	0,482
7	3	1,5	1	0,234	5,077	X ₂ X ₃	-0,495	-0,225
8	5	1,5	1	0,643	4,083	X ₁ X ₂ X ₃	-0,096	-0,211

Для исследования был выбран полный факторный эксперимент типа 2³. Опыт в каждой точке матрицы дублировали трижды, то есть m=3. Однородность дисперсий проверяли по критерию Кохрена

$$G_p = \frac{\max\{\sigma^2(V_i)\}}{\sum_{i=1}^n \sigma^2\{Y_i\}}, \quad (3.1)$$

с числами степеней свободы $v_1=2$; $v_2=8$ и уровнем значимости $q=5\%$. В данном случае максимальное значение критерия Кохрена для протеиназы $G_{p1}=0,3885$, для кератиназы $G_{p2}=0,4573$. Расчетные значения этого критерия во всех случаях меньше табличного (G_{p1} ; $G_{p2} < G_T=0,5157$). Следовательно, процесс воспроизводим и при планировании можно предсказать ожидаемые результаты эксперимента.

В результате статистической обработки экспериментальных данных получены уравнения регрессии, описывающие данный процесс под влиянием исследуемых факторов (табл.3.7). Проверку коэффициентов регрессии на значимость проводили по критерию Стьюдента для уровня значимости $q=5\%$ и числа степеней свободы $v=16$ по формуле:

$$G_p = \frac{|b_i|}{\sigma^2\{b_i\}}, \quad (3.2)$$

В данном случае для протеиназы незначимым оказался только коэффициент $b_{1,2}$, для кератиназы – b_1 , b_2 , $b_{1,3}$, $b_{2,3}$, $b_{1,2,3}$. Эти коэффициенты можно отбросить и в дальнейших расчетах не учитывать.

Гипотезу об адекватности представляемых результатов эксперимента проверяли с помощью критерия Фишера

$$F = \frac{\sigma_{ad}^2}{\sigma_{воспр}^2\{Y\}}, \quad (3.3)$$

В данном случае расчетное значение критерия Фишера для протеиназы $F_{p1}=0,0343$, для кератиназы – $F_{p2}=0,1838$. В обоих случаях расчетное значение критерия меньше табличного ($F_{т.1}=4,49$; $F_{т.2}=2,85$) при числе степеней свободы для протеиназы $v_1=1$; $v_2=16$, для кератиназы – $v_1=5$; $v_2=16$ и уровне значимости $q=5\%$. Поэтому гипотеза об адекватности данных математических представлений результатов эксперимента может быть принята. Уравнения регрессии имеют вид:

$$Y_{\text{протеиназа}} = 1,076 + 0,208X_1 + 0,691X_2 + 0,549X_3 + 0,161X_1 X_3 - 0,495X_2 X_3 - 0,096X_1 X_2 X_3$$

$$Y_{\text{кератиназа}} = 3,019 + 1,018X_3 - 0,968 X_1 X_2$$

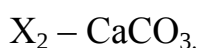
Положительные коэффициенты b_1 , b_2 и b_3 в уравнении для протеиназы свидетельствуют о необходимости увеличения концентрации крахмала, соевой муки и пера. На это указывает также положительное взаимодействие факторов X_1 (крахмал) и X_3 (перо). Анализ уравнения регрессии для кератиназы показал, что наибольшее влияние на выходной параметр (КА) оказывает фактор X_3 – перо.

2 этап.

Большое влияние на синтез ферментов оказывает присутствие в среде минеральных элементов. Некоторые из них (магний, кальций, калий, железо) нужны в достаточно высоких концентрациях, потребность в других (цинк, марганец, натрий, молибден, медь, ванадий, кобальт, никель) – невелика [55, 159].

Роль последних определяется тем, что они входят в состав основных клеточных метаболитов и, таким образом, участвуют в осуществлении жизненно важных функций организма. Повышение содержания минеральных элементов приводит к торможению нормального роста клетки. Это необходимо учитывать при внесении в питательные среды органических источников питания. Многие из них содержат значительные количества минеральных веществ [13,82].

Основными факторами, влияющими на развитие микроорганизма, были выбраны



Концентрация других компонентов среды оставалась на базовом уровне.

Пределы изменения исследуемых факторов даны в таблице 3.8.

Таблица 3.8 Пределы изменения факторов

Факторы	X_1 , %	X_2 , %
Основной уровень	0,045	0,3
Интервал варьирования	0,035	0,1
Верхний уровень	0,080	0,4
Нижний уровень	0,010	0,2

Матрица планирования полнофакторного эксперимента 2^2 и результаты эксперимента представлены в таблице 3.9, $m = 3$.

Таблица 3.9 Матрица планирования и результаты эксперимента

№ сред ы	X_1 , KH_2P O_4 %	X_2 , CaCO $_3$, %	Активность ферментативная ед/ см^3 (Y)		обозначен ие строк в матрице	Коэффициенты регрессии, b_i	
			протеина за	кератина за		протеина за	кератина за
1	0,010	0,2	0,100	0,7	X_0	0,4230	15,425
2	0,080	0,2	0,061	1,1	X_1	0,2580	2,575
3	0,010	0,4	0,230	1,8	X_3	0,0680	6,925
4	0,080	0,4	0,750	2,6	$X_1 X_2$	0,0025	1,015

Расчетное значение критерия Кохрена для протеиназы $G_{p1} = 0,0730$, для кератиназы – $G_{p2} = 0,4297$. Они меньше табличного значения $G_T = 0,7679$ с числами степеней свободы $\nu_1 = 2$; $\nu_2 = 4$ и уровнем значимости $q = 5\%$. Значит дисперсии однородны.

После определения оценок b_i коэффициентов регрессии проверяли их значимость по критерию Стьюдента для уровня значимости $q = 5\%$ и числа степеней свободы $\nu = 8$. Для протеиназы незначимыми оказались b_2 и $b_{1,2}$, для кератиназы – $b_{1,2}$.

При проверке адекватности полученных математических моделей расчетные значения критерия Фишера для протеиназы и кератиназы оказались меньше табличных: $F_{p1} = 0,008$ ($F_{T1} = 4,46$); $F_{p2} = 0,391$ ($F_{T2} = 5,32$) при числе степеней свободы $\nu_1 = 2$; $\nu_2 = 8$ для протеиназы и $\nu_1 = 1$; $\nu_2 = 8$ для кератиназы и уровне значимости $q = 5\%$. Гипотеза представления результатов эксперимента принимается. Уравнения регрессии имеют вид:

$$Y_{\text{протеиназа}} = 0,423 + 0,258X_1,$$

$$Y_{\text{кератиназа}} = 1,543 + 0,258X_1 + 0,693X_2$$

Из анализа уравнений можно сделать вывод, что на биосинтез ферментов положительное влияние оказывает фактор X_1 (KH_2PO_4). Присутствие CaCO_3 (фактор X_2) в среде оказывает благоприятное воздействие на синтез кератиназы.

3 этап.

Основными факторами, влияющими на рост и биосинтез микроорганизма были выбраны

$$X_1 - \text{NH}_4\text{NO}_3,$$

$$X_2 - (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4,$$

при неизменной концентрации всех других компонентов среды.

Пределы изменения, взятых для исследования, факторов указаны в таблице 3.10 [53].

Таблица 3.10 Пределы изменения факторов

Факторы	X_1 , %	X_2 , %
Основной уровень	0,065	0,065
Интервал варьирования	0,035	0,035
Верхний уровень	0,100	0,100
Нижний уровень	0,030	0,030

Исследования проводили с помощью полного факторного эксперимента типа 2^2 . Матрица планирования и результаты эксперимента представлены в таблице 3.11, $m = 3$.

Таблица 3.11 Матрица планирования и результаты эксперимента

№ сред ы	X_1 , NH_4NO_3 %	X_2 , $(\text{NH}_4)_2\text{S}$ O_4 , %	Активность ферментативная ед/ см^3 (Y)		обознач ение строк в матрице	Коэффициенты регрессии, b_i	
			протеина за	керати наза		протеи наза	кератиназ а
1	0,03	0,03	0,261	1,3	X_0	0,626	2,675
2	0,10	0,03	0,501	2,3	X_1	-0,134	-0,775
3	0,03	0,10	0,723	5,6	X_2	-0,245	0,875
4	0,10	0,10	1,017	1,5	$X_1 X_2$	0,014	-1,275

Критерий Кохрена для протеиназы $G_{p1} = 0,535$, для кератиназы – $G_{p2} = 0,4807$. Табличное значение $G_T = 0,7679$ при числе степеней свободы $\nu_1 = 2$; $\nu_2 = 4$ и уровне значимости $q = 5\%$. Из этого следует, что $G_{p1} < G_T$ и $G_{p2} < G_T$, следовательно, дисперсии однородны.

Значимость коэффициентов регрессии b_i проверяли по критерию Стьюдента для числа степеней свободы $\nu = 8$ и уровня значимости $q = 5\%$. Для протеиназы незначимым оказался $b_{1,2}$, для кератиназы – все коэффициенты незначимы. Возможно, NH_4NO_3 и $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ не оказывают существенного влияния на накопление кератиназной активности в таких концентрациях.

Дальнейший анализ регрессионного уравнения для протеиназы заключался в проверке его адекватности. В данном случае, расчетное

значения критерия Фишера составило $F_{p1} = 0,017$. Оно меньше табличного ($F_{p1} < F_T = 5,32$) для числа степеней свободы $\nu_1 = 1$; $\nu_2 = 8$ и уровня значимости $q = 5\%$. Следовательно, гипотеза об адекватности модели принимается. Регрессионное уравнение имеет вид:

$$Y_{\text{протеиназа}} = 0,626 - 0,134X_1 - 0,245X_2$$

Отрицательные знаки у коэффициентов b_1 и b_2 свидетельствуют о необходимости уменьшить концентрации NH_4NO_3 и $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Поэтому считаем целесообразным исключить эти компоненты из питательной среды. Можно предположить, что присутствие в среде таких источников азота, как перо, соевая мука, обеспечивают потребности микроорганизма в азотном питании полностью и необходимость в NH_4NO_3 и $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ отпадает.

Таким образом, после ПФЭ был определен состав среды для культивирования продуцента кератинрасщепляющей протеиназы *Str. chromogenes s.g. 0832*. Далее было проведено выращивание данного микроорганизма на среде состава (г/дм³): картофельный крахмал – 50; соевая мука – 5; перо – 10; KH_2PO_4 – 0,80; CaCO_3 – 4,0; FeSO_4 – 0,010; MnCl_2 – 0,010; ZnSO_4 – 0,020; $\text{pH}_{\text{исх}} = 6,75$ при температуре 28–30⁰С в течение 120 часов. Протеолитическая активность составила 3,33 ед/см³, кератиназная – 23 ед/ см³. При сравнении с исходной средой, активность по протеиназе возросла в 1,5 раза, а по кератиназе – в 7,6 раза.

Представлялось интересным выяснить влияние микроколичеств FeSO_4 , MnCl_2 , ZnSO_4 на накопление протеолитической и кератиназной активности в культуральной жидкости *Str. chromogenes s.g. 0832*. С этой целью из питательной среды состава (г/дм³): картофельный крахмал – 50; соевая мука – 5; перо – 10; KH_2PO_4 – 0,80; CaCO_3 – 4,0; FeSO_4 – 0,010; MnCl_2 – 0,010; ZnSO_4 – 0,020 исключали каждую из последних трех солей. Данные эксперимента показали, что отсутствие MnCl_2 повышает протеолитическую и кератиназную активности в 1,3 раза по сравнению с контрольной средой. Присутствие FeSO_4 и ZnSO_4 необходимо, так как без этих солей протеолитическая активность снижается в 1,5 раза (FeSO_4) и в 1,7 раза

(ZnSO_4), кератиная активность – соответственно без FeSO_4 уменьшается в 1,5 раза, без ZnSO_4 – равна нулю (табл. 3.12).

Таблица 3.12 Влияние FeSO_4 , MnCl_2 , ZnSO_4 на протеолитическую и кератиная активность

№ среды	Среда культивирования	Активность ферментативная, ед/см ³	
		протеиназа	кератиназа
1	Контроль	3,33	22,7
2	Среда без MnCl_2	4,17	30,0
3	Среда без ZnSO_4	2,00	0
4	Среда без FeSO_4	2,25	15,1

Таким образом, в среде культивирования *Str. chromogenes s.g. 0832* для биосинтеза кератинащепляющей протеиназы необходимо присутствие FeSO_4 и ZnSO_4 . Причем без ZnSO_4 кератиная активность не проявлялась совсем. А MnCl_2 лучше исключить из среды. Без него протеолитическая активность возрастает на 25% , кератиная активность также достигает высокого значения.

Рост и развитие микроорганизмов, биосинтез ими ферментов в значительной степени зависят от кислотности среды [66]. По литературным данным микроорганизмы, продуцирующие кератинащепляющую протеиназу, имеют оптимум pH обычно в щелочной области от 7,0 до 12,0 [144,222,246]. Возможно, это связано с тем, что основные продуценты кератиназы – актиномицеты обитают в почве. Она же, как правило, обогащена щелочными минералами, экскрементами животных, разлагающимися белками. В таких почвах величина pH может достигать высоких щелочных значений. Чтобы выжить микроорганизмы приспособились к таким условиям и изменили оптимум pH роста в более щелочную зону. Так, если биосинтез ферментов *Actinomyces fraoliae* 119 [217] и *Keratinomyces ajelloi* [302] происходит при величине pH = 7,2–7,4, то кератиназа Никерсона и Новаля синтезируется уже при pH = 8,3–8,4 [297].

Streptomyces griseus образует протеолитические ферменты с кератинразрушающей способностью при величине рН =10,5 [259].

Влияние величины рН на биосинтез ферментов *Str. chromogenes s.g. 0832* изучали в диапазоне рН от 5 до 12 (рис. 3.1). Максимальные значения протеолитической и кератиназной активности наблюдаются при доведении начальной величины рН до 11,0 (ПА=3,778 ед/см³; КА=29,0 ед/см³). Наибольшая растворимость пера также достигается при этом значении рН и составляет 84% (рис. 3.2).

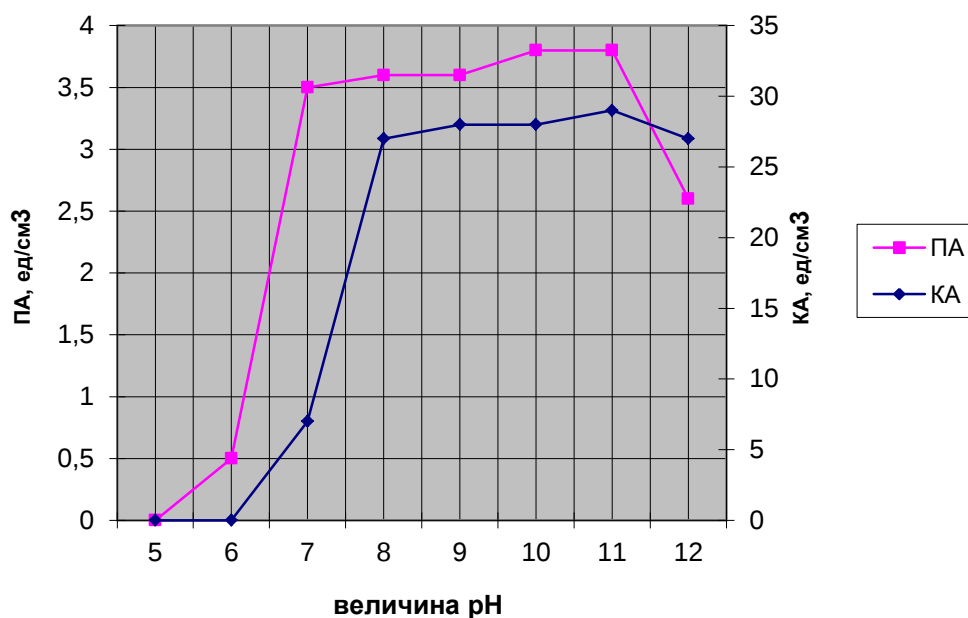


Рисунок 3.1 Влияние величины рН на биосинтез протеиназ *Str. chromogenes s.g. 0832*

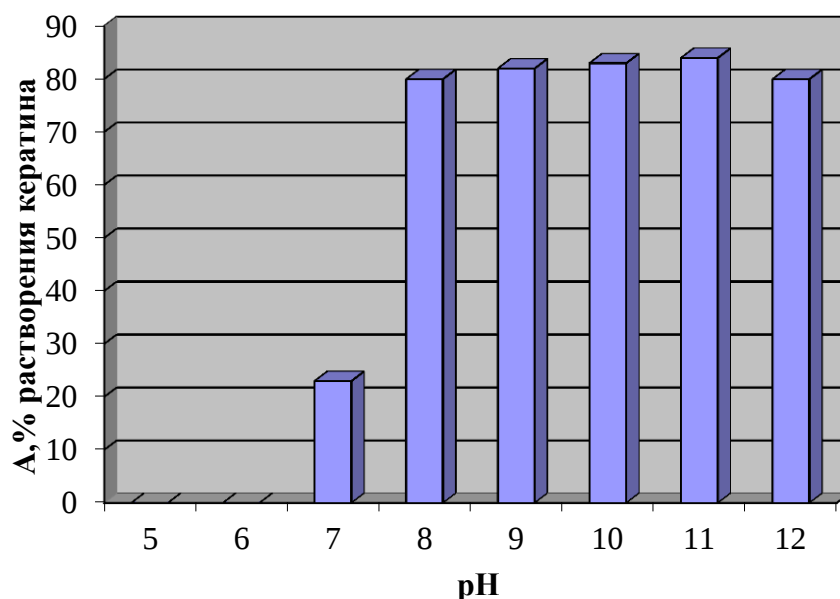


Рисунок 3.2 Влияние величины рН на растворение кератина

Следующим этапом оптимизации биосинтеза протеиназы *Str. chromogenes* s.g. 0832 было изучение динамики биосинтеза ферментов. Рост микроорганизма характеризуется короткой лаг-фазой, продолжительностью около 8 часов, за ней следует фаза роста, в которой интенсивно потребляются питательные вещества, увеличивается биомасса и к 48 часам ее накапливается наибольшее количество. После 48 часов часть клеток претерпевает лизис, о чем свидетельствует уменьшение их биомассы (рис.3.3). Максимальные значения протеолитической и кератиназной активности наблюдаются также к этому времени: ПА=6,044 ед/ см³, КА=34,0 ед/см³. Заметим, что протеолитическая активность резко падает уже к 72 часам выращивания в отличие от кератиназной, которая на протяжении 96 часов относительно стабильна (рис. 3.4).

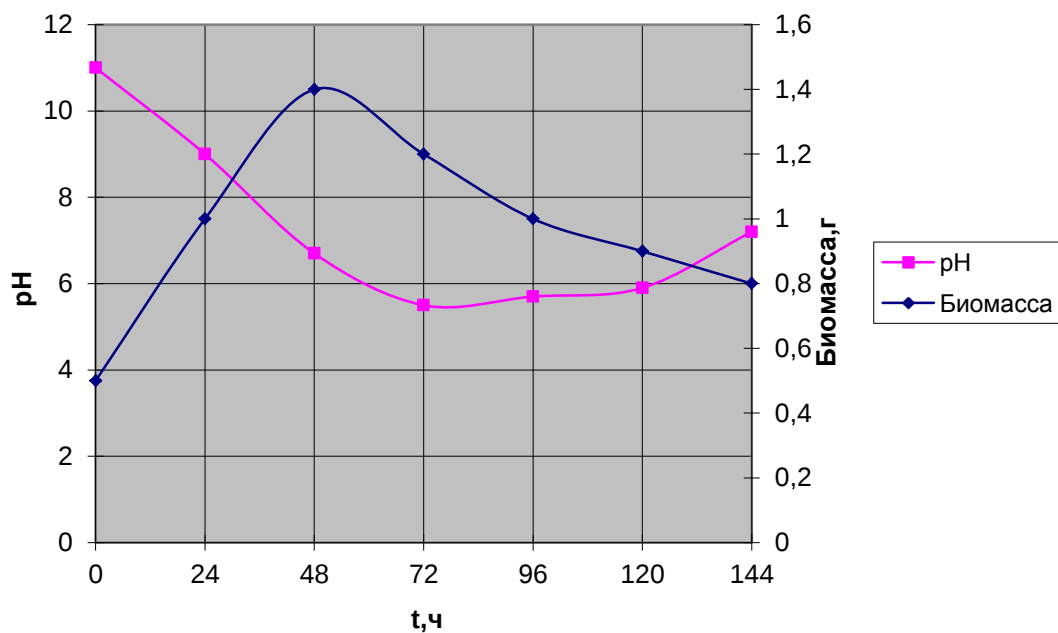


Рисунок 3.3 Рост *Str. chromogenes s.g. 0832* и изменение величины pH в зависимости от времени культивирования

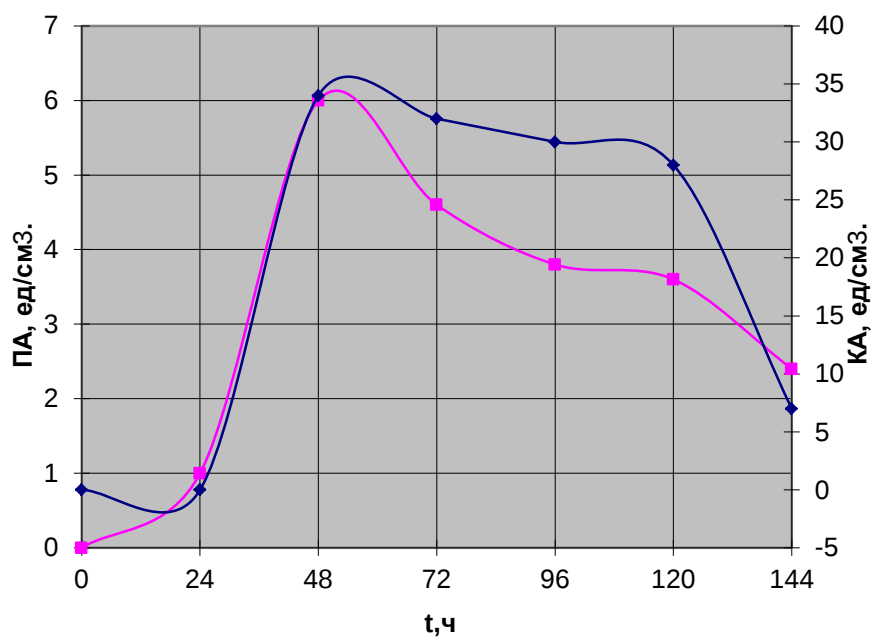


Рисунок 3.4 Накопление протеолитической (ПА) и кератиназной (КА) активности у *Str. chromogenes s.g. 0832* в зависимости от времени культивирования

Проведенные исследования позволяют сделать следующие выводы:

— на биосинтез ферментов существенное влияние оказывает присутствие органического азота в виде соевой муки и пера;

- необходимым источником углерода является картофельный крахмал;
- синтез кератинрасщепляющей протеиназы зависит от микроколичеств FeSO_4 , ZnSO_4 [171];
- культивирование микроорганизма в оптимальных условиях повышает его биосинтетическую способность, увеличивая протеолитическую активность в 3 раза, кератиназную – в 11 раз по сравнению с контрольной средой [96]; сокращает время выращивания на 3 суток по сравнению с выращиванием в исходной среде;
- к 48 часам биосинтеза 84% пера в среде переходит в растворимую форму, что позволяет решить проблему утилизации отходов мясной и птицеперерабатывающей промышленности.

В целях создания биофлокулянта широкого круга действия была проведена модификация питательной среды. Ряд зарубежных ученых [289,291,293,311,315,327] отмечает, что внесение в среду культивирования микроорганизмов, коагулянтов и синтетических флокулянтов улучшает очистку стоков. Культивирование *Str. chromogenes* s.g. 0832 проводили в оптимальных условиях при добавлении флокулянта полиакриламида (ПАА) и коагулянта $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ в количестве 0,003%.

Через 48 часов выращивания культуральную жидкость вносили в сток в соотношении 3:100 и через 10 мин. определяли показатели, характеризующие качество очистки сточной воды (табл. 3.13).

Таблица 3.13 Очистка сточной воды модифицированным биофлокулянтom *Str. chromogenes* s.g. 0832

Показатели	Исходный сток	КЖ + сток	Культивирование с $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ + сток	Культивирование с ПАА + сток
ХПК, мг $\text{O}_2/\text{дм}^3$	1500±45,12	200 ±6,07	160 ± 3,48	110 ± 3,32
Мутность, мг/дм ³	4,2 ± 0,11	1,3 ± 0,01	1,1 ± 0,01	0,4 ± 0,01

Окончание табл. 3.13

Общее железо, мг/дм ³	1,15 ± 0,01	0,27 ± 0,01	0,21 ± 0,01	0,15 ± 0,01
ζ-потенциал клеток, мВ	+17,80	-28,60	-43,40	-53,20
Общий азот, мг/дм ³	160 ± 2,03	52,3 ± 1,01	41,7 ± 0,59	32,1 ± 0,47

Дополнительное внесение в среду культивирования полиакриламида и $Al_2(SO_4)_3$ улучшают эффект очистки по всем рассмотренным показателям. Так при культивировании с $Al_2(SO_4)_3$ степень очистки стока по ХПК на 20%, а при культивировании с ПАА – на 45% выше, чем при очистке культурой микроорганизма, выращенной на традиционной питательной среде. Можно предположить, что в процессе роста актиномицета формируется пространство между клетками микроорганизма и молекулами ПАА и $Al_2(SO_4)_3$ с образованием «биоматрицы». В этой матрице концентрируются и хранятся питательные вещества, а так же внеклеточные ферменты. Как следствие увеличивается общая молекулярная масса.

При этом адсорбционный слой полиэлектролита формируется непосредственно на клеточной поверхности актиномицета. Кроме того, происходит взаимодействие между реагентом и компонентами поверхности клетки, а также компонентами среды и продуктами метаболизма. Макроионы ПАА и $Al_2(SO_4)_3$ образуют с компонентами культуральной жидкости сложные соединения, которые входят в состав агрегатов, формирующихся при биофлокуляции.

Адсорбция катионных полиэлектролитов приводит к снижению уровня ζ-потенциала клеток, при которой происходит максимальное снижение агрегативной устойчивости системы. На этом основании можно предположить, что наиболее вероятным механизмом флокуляции в данном случае является уменьшение электростатических сил отталкивания.

Таким образом, проведенные исследования позволяют утверждать, что *Str. chromogenes* s.g. 0832 может быть рекомендован для удаления из сточных вод органических загрязнений. Следует также отметить, что при очистке сточных вод культуральной жидкостью *Str. chromogenes* s. g. 0832 биосорбция в основном протекает за счет механизма «мостикообразования» [65,100], а при культивировании данного микроорганизма с ПАА и $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ – основную роль играют электростатические силы отталкивания [156,250].

4 ИЗУЧЕНИЕ ФЕРМЕНТНЫХ СИСТЕМ *STR. CHROMOGENES S.G. 0832*

4.1 Получение комплексного ферментного препарата из культуральной жидкости *Str. chromogenes s.g. 0832*

Ранее говорилось о том, что в результате биосорбционной очистки стоков наряду с сорбцией загрязнений на поверхности клеток микроорганизма может происходить и ферментивное разложение загрязняющих веществ [48,112,115,225,264,316]. Поэтому представляло определенный интерес изучить ферментные системы *Str. chromogenes s.g. 0832* и их физико-химические свойства. Но так как последнее предполагает работу с очищенными препаратами, то необходимо было провести осаждение ферментов из водных растворов органическими растворителями – этанолом, изопропанолом, ацетоном.

В качестве осадителей использовали 96,5%-ный этанол, 98%-ный изопропанол и химически чистый ацетон. Осаждение проводили при низкой температуре во избежание инактивации фермента. С этой целью водный раствор фермента и прибавляемый осадитель были охлаждены до температуры 3–5⁰С. Образовавшийся осадок отделяли центрифугированием, высушивали на воздухе, взвешивали, после чего определяли протеолитическую и кератиназную активности, количество белка по Лоури. Осаждение ферментного препарата из культуральной жидкости осуществляли при значениях pH от 4,0 до 10,0.

Для получения ферментного препарата с высокой кератиназной активностью лучшим является значение pH =7,0 (рис.4.1). Это величина pH соответствует и максимальному выходу препарата по протеолитической активности (рис 4.2). Очевидно, изоэлектрическая точка протеолитического комплекса *Str. chromogenes s.g. 0832* находится в области pH, близкой к 7,0 [125].

Но зависимость протеолитической и кератиназной активности от pH имеет некоторые отличия. В интервале pH= 6,0–9,0 кератиназная активность изменяется незначительно и держится на уровне не ниже 80% (рис. 4.1).

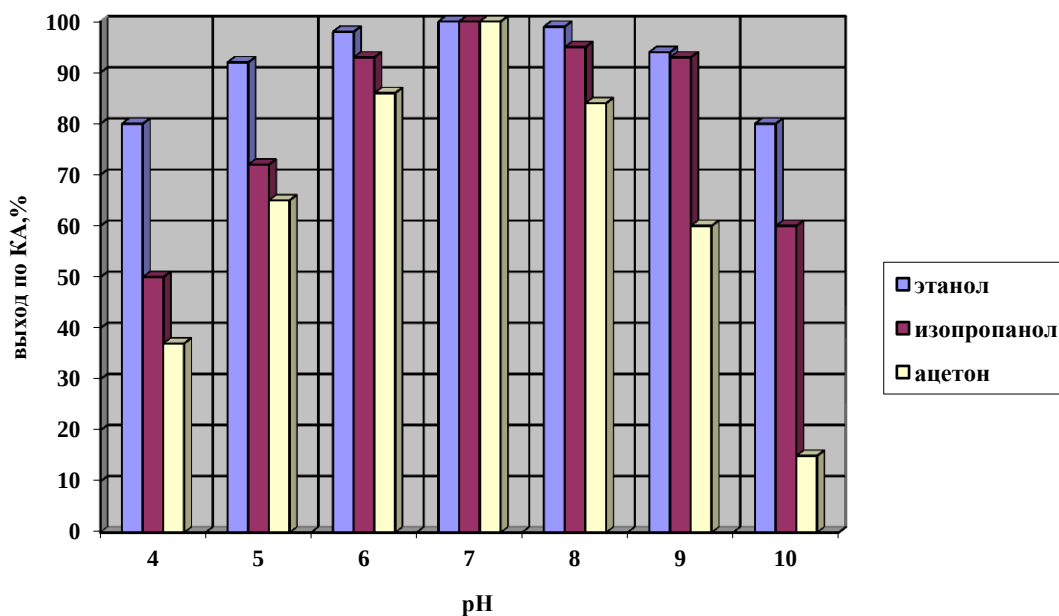


Рисунок 4.1 Влияние величины pH на осаждение протеолитического комплекса из культуральной жидкости *Str. chromogenes* s.g. 0832 по кератиназной активности (КА)

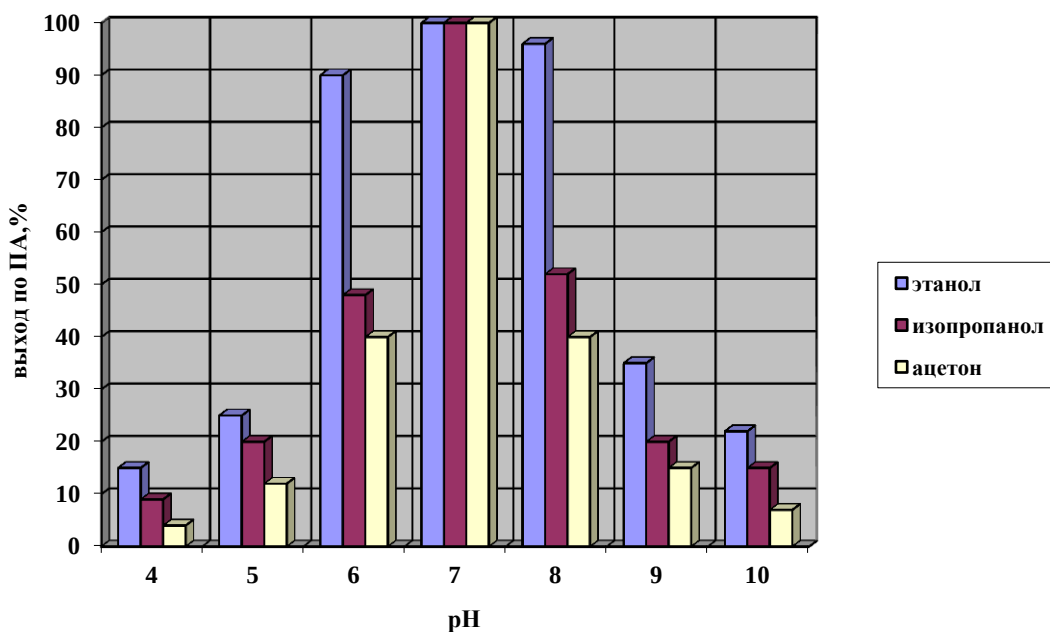


Рисунок 4.2 Влияние величины pH на осаждение протеолитического комплекса из культуральной жидкости *Str. chromogenes* s.g. 0832 по протеолитической активности (ПА)

На протеолитическую активность величина pH оказывает существенное влияние, так как происходит резкое её увеличение с 40 – 50 % при pH= 6,0 до 100% (pH=7,0) и также резкое снижение до 15 – 35 % при pH= 9,0.

Различные соотношения культуральной жидкости и растворителей (1:1, 1:2, 1:3, 1:4) не влияют на осаждение комплексного ферментного препарата при оптимальном значении pH. Однако концентрация органического растворителя оказывает существенное влияние на активность препарата и степень его очистки [123].

Лучшим осадителем для протеиназы с кератинолитическим действием является изопропанол в концентрации 50% (в объемных отношениях 1:1). Удельная КА составила 21,83 ед/см³ белка, ПА – 3,33 ед/см³ белка. При этом очистка кератиназы возросла в 15 раз (табл.4.1).

При осаждении этанолом необходимо увеличить концентрацию растворителя до 77,2% (в объемных отношениях 1:4). В этом случае удельная КА несколько ниже – 11,19 ед/см³ белка и степень очистки меньше почти в 2 раза по сравнению с осаждением изопропанолом и составляет 7,66. Протеолитический комплекс при осаждении этанолом в соотношении 1:4 имел приблизительно одинаковую степень очистки с протеолитическим комплексом, осаждаемым изопропанолом в соотношении 1:1 – 2,63 и 2,53 соответственно. Удельная активность у них также находилась практически на одном уровне (табл. 4.1).

Применение ацетона в качестве осаждающего агента показало, что в концентрациях, взятых нами для проведения эксперимента, он оказался менее всего пригодным для получения кератинрасщепляющей протеиназы. Заметим, однако, что при соотношении 1:2 значительно возрастает удельная ПА (6,92 ед/мг белка) по сравнению с этанолом и изопропанолом. А также степень ее очистки. Но по кератиназе степень очистки хуже, чем при использовании изопропанола (4,59 и 9,43 соответственно) и приблизительно одинаковая со степенью очистки препарата этанолом (4,59 и 4,49 соответственно).

Таким образом, для получения технического препарата протеиназы с кератинолитическим действием можно успешно использовать любой из указанных органических растворителей в оптимальных концентрациях. Осаждение следует вести при значении $pH=7,0$. Однако для получения фермента с высокой активностью и с экономических позиций наиболее эффективен изопропанол в концентрации 50%.

Это отмечают многие исследователи [79,245,277]. К тому же, при осаждении изопропанолом, протеиназы менее чувствительны к температуре. Используемая нами культуральная жидкость *Str. chromogenes* s.g. 0832 для получения препарата протеиназы, специфичной к кератину, не требует доведения величины pH до 7,0, так как pH конечное культуральной жидкости колеблется, как правило, в пределах 6,9–7,1.

Таблица 4.1 Получение препарата протеиназы с кератинолитическим действием из культуральной жидкости
Str. chromogenes s.g. 0832 осаждением органическими растворителями

Содержание осадителя		Общая активность		Белок, г·10 ⁻³ /см ³	Суммарный белок, г·10 ⁻³	Вес препарата, г·10 ⁻³	Удельная активность		Степень очистки	
В объемных отношениях	%	ПА, ед/г	КА, ед/г				ПА, ед/г·10 ⁻³ белка	КА, ед/г·10 ⁻³ белка	ПА	КА
Культуральная жидкость рН 7,0		3,33 ед/ см ³	3,7 ед/ см ³	2,530	126,5	-	1,32	1,46	1	1
Изопропанол										
1:1	50,0	1150	7550	0,345	410,6	1190	3,33	21,88	2,53	14,9 9
1:2	66,6	325	1500	0,109	483,9	4440	2,89	13,76	2,26	9,43
1:3	75,0	200	1000	0,083	421,6	5080	2,41	12,05	1,83	8,25
1:4	80,0	142	1600	0,132	145,2	1100	1,08	12,12	0,82	8,30
Этанол										
1:1	48,0	767	100	0,299	164,5	550	2,37	0,33	1,95	0,23
1:2	64,0	1000	2150	0,328	170,6	520	3,05	6,56	2,31	4,49
1:3	72,0	1100	2300	0,282	719,1	2550	3,90	8,16	2,96	5,59
1:4	77,2	1257	4050	0,362	955,7	2640	3,47	11,19	2,63	7,66
Ацетон										
1:1	50,0	385	0	0,311	615,8	1980	1,27	0	0,96	0
1:2	66,6	1031	1000	0,149	323,3	2170	6,92	6,71	5,24	4,59
1:3	75,0	1000	600	0,305	314,2	1030	3,28	1,97	2,48	1,35
1:4	80,0	444	0	9,138	484,4	3510	3,22	0	2,34	0

4.2 Исследование физико-химических свойств препарата протеиназы *Str. chromogenes s.g. 0832*

Результаты по влиянию значений величины рН на протеолитическую и кератиразную активности представлены на рисунке 4.3, рН оптимум для них соответствует 8,0. По графикам рисунка 4.3 можно сделать вывод о большей зависимости протеолитической активности от кислотности среды в сравнении с кератиразной активностью. При значениях рН = 6,0; 7,0 и 9,0 протеолитическая активность составляла соответственно 20; 65 и 75% – от оптимальной, а кератиразная активность при этих же величинах рН – 75; 95 и 90% соответственно.

Как показали наши исследования (рис. 4.4), температурный оптимум для протеиназы и кератиразы совпадает и равен 40⁰С. Интересно отметить, что ферментный препарат по проявлению кератиразной активности более термоустойчив, чем по протеолитической. Например, при 70⁰С протеолитическая активность снизилась до 3%, а кератиразная – до 30% от исходного значения.

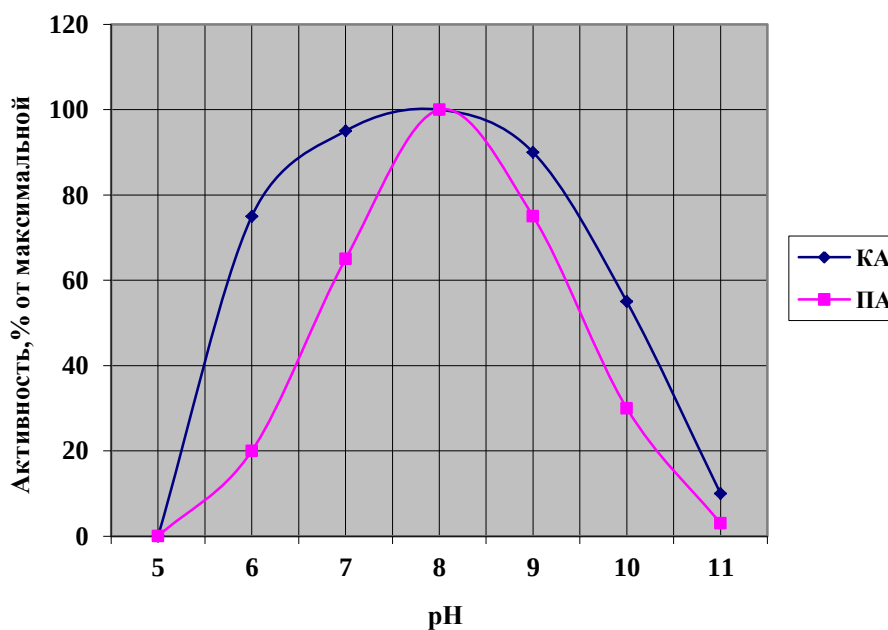


Рисунок 4.3 Влияние рН на активность ферментов
Str. chromogenes s.g. 0832

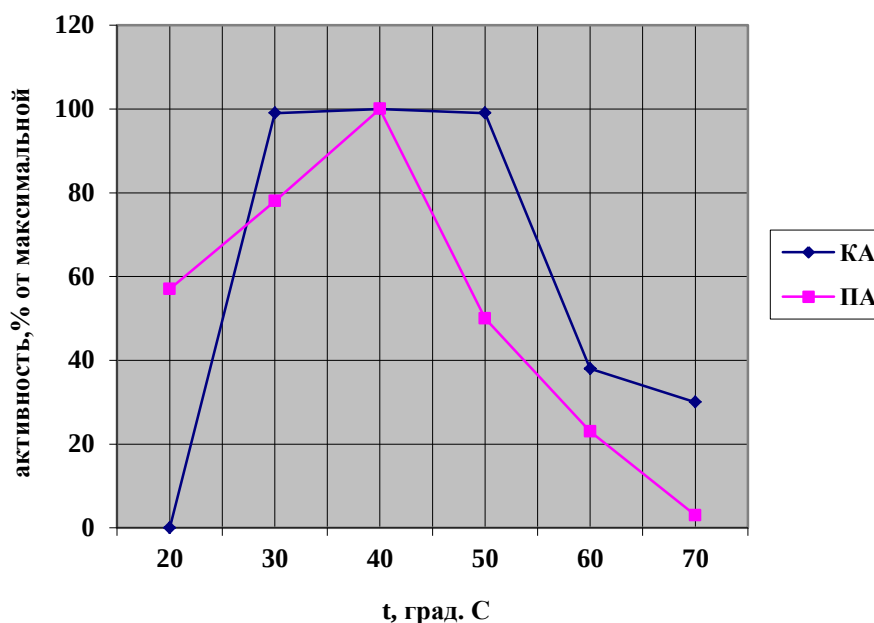


Рисунок 4.4 Влияние температуры на активность ферментов *Str. chromogenes s.g. 0832*

На основании проведенных исследований можно сделать вывод, что ферменты *Str. chromogenes s.g. 0832* проявляют максимальную активность при pH = 7,0–9,0 в температурном интервале 30–50⁰С.

4.3 Очистка протеолитического комплекса *Str. chromogenes s.g. 0832*

Глубокое изучение физико-химических свойств ферментов требует их высокой очистки. Анализ литературных данных показал, что ряду российских и зарубежных исследователей удалось получить высокоочищенную кератиназу [217,243,247,299]. В своей работе мы руководствовались этими материалами и общими рекомендациями по очистке протеолитических ферментов [32,33,113,297].

Данные по очистке протеолитического комплекса *Str. chromogenes s.g. 0832* представлены в таблице 4.2.

Таблица 4.2 Очистка кератинрасщепляющей протеиназы
Str. chromogenes s.g. 0832

Стадия очистки	Активность		Белок, мг	Удельная активность		Степень очистки		Выход, %	
	ПА, ед	КА, ед		ПА, ед/мг	КА, ед/мг	ПА	КА	ПА	КА
Культуральная жидкость	2331	2590	1771	1,32	1,46	1,00	1,00	100	100
Освобождение от балласта (насыщение 0,2) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1398	1800	1206	1,16	1,49	0,88	1,02	60,0	69,5
Высаливание $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ насыщение 0,8	600	2100	300	2,00	7,00	1,52	4,79	25,7	81,1
Диализ	300	1077	43	6,98	25,1	5,29	17,19	12,9	41,6
Осаждение изопропанолом при соотношении объемов 1:1	300	1200	6,4	46,9	187,5	35,5	128,4	12,9	46,3
Гель-проникающая хроматография через сефадекс G-100:									
фракция I	0,35	70	0,30	1,17	233,30	0,89	159,80	0,02	2,70
фракция II	0,80	0	0,62	1,30	0,00	0,99	0,00	0,03	0,00

Первой стадией очистки было освобождение от балластных белков с помощью высаливания сульфатом аммония насыщением 0,2. Перед высаливанием для стабилизации ферментов и лучшего образования осадка в исходную культуральную жидкость вносили 3% хлорида кальция [269]. Образовавшийся осадок отделяли центрифугированием и удаляли. Центрифугат подвергали высаливанию сульфатом аммония насыщением 0,8. Время высаливания длилось 24 часа, после чего осадок вновь отделяли центрифугированием и надосадочную жидкость отбрасывали. На этой стадии степень очистки кератиназы возросла в 5 раз при удельной активности 7

ед/мг белка, протеиназа подвергалась очистке слабо и степень ее очистки увеличилась только на 50%. Затем осадок растворяли в дистиллированной воде и подвергали диализу до полного удаления из раствора фермента солей. Раствор после диализа осаждали изопропанолом при соотношении 1:1. Образовавшийся осадок центрифугировали и высушивали. В полученном препарате ккератиная активность возросла в 1,1 раза, протеолитическая - наоборот снизилась на 70% по сравнению с исходной.

Заключительным этапом очистки была гель-проникающая хроматография на сефадексе G-100. На колонку с сефадексом наносили 3 см³ раствора, содержащего 10 мг белка и элюировали со скоростью 5 см³/час фосфатным буфером, рН= 7,0. Профиль элюции представлен на рисунках 4.5, 4.6.

Выходящий из колонки раствор белка собирали по 5 см³ и в них определяли ПА, КА и белок. По данным гель-фильтрации получили две белковые фракции. Первая из них проявляла кератиновую и протеолитическую активность, вторая – протеолитическую. О том, что очищаемый по нашему методу препарат имеет специфичную кератиназу, свидетельствует тот факт, что от стадии к стадии кератиная активность возрастала, тогда, как протеолитическая активность снижалась. По нашей схеме очистки удалось получить кератиназу с удельной активностью, превышающей исходную – в 160 раз.

Электрофоретические исследования данного ферментного препарата (рис. 4.7) подтвердили, что он состоит из двух белковых фракций, отличающихся подвижностью в электрофоретическом поле, интенсивностью окраски белковых полос. При специфическом проявлении на активность было установлено, что в первой белковой фракции сосредоточена вся кератиная активность и очень низкое содержание протеолитической активности. Вторая белковая фракция проявляла типичные свойства протеиназы, поэтому мы обозначили первую белковую фракцию кератиназой, а вторую – протеиназой.

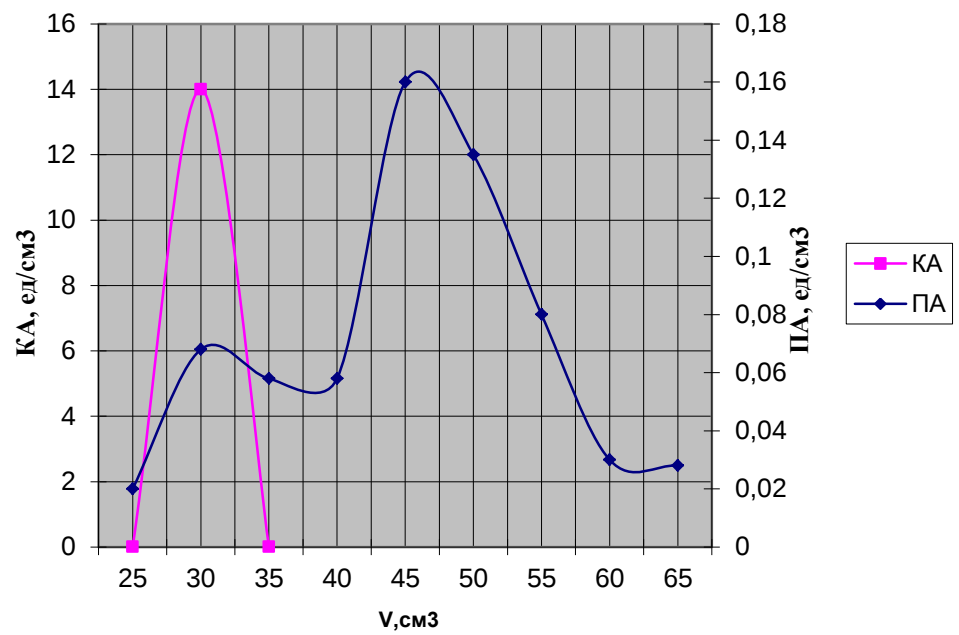


Рисунок 4.5 Выход кератиназы (КА) и протеиназы (ПА) при фракционировании на колонке с сефадексом G-100

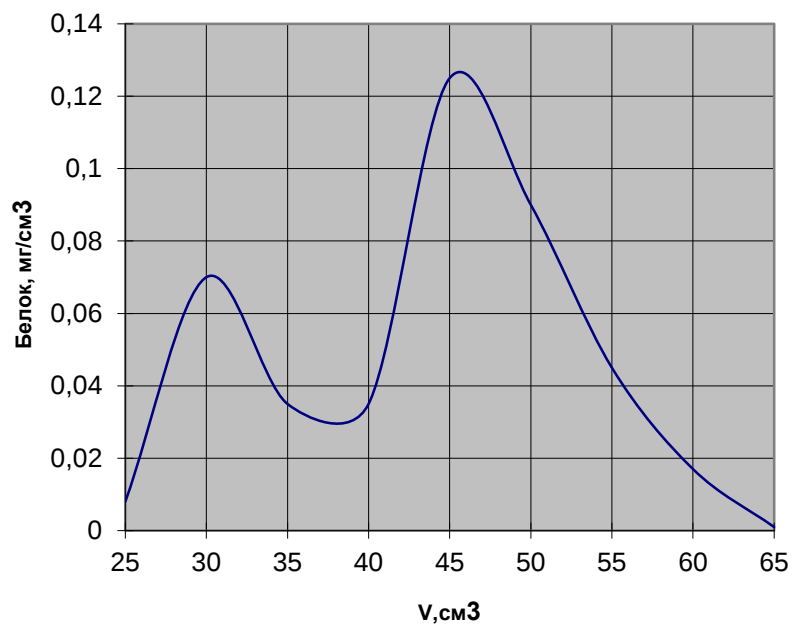


Рисунок 4.6 Выход общего белка при фракционировании на колонке с сефадексом G-100

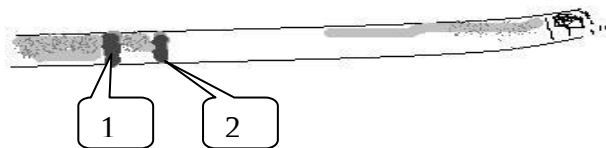


Рисунок 4.7 Фракционирование препарата кератинрасщепляющей протеиназы *Str. chromogenes* s.g. 0832 методом диск-электрофореза в полиакриламидном геле. 1,2 – нумерация белковых фракций по подвижности: 1 – кератиназа; 2 – протеиназа.

Таким образом, впервые была получена кератиназа из *Str. chromogenes* s.g. 0832. Предложенная схема очистки эффективна и обеспечивает получение электрофоретически гомогенной кератиназы с удельной активностью 233 ед/мг белка.

Аминокислотный состав кератинрасщепляющей протеиназы *Str. chromogenes* s.g. 0832 (табл. 4.3) показывает, что фермент представлен широким набором аминокислот. Содержание незаменимых аминокислот по отношению к их общему количеству составляет 34%. Из них на долю треонина приходится 9,2%, высоко также содержание лизина и лейцина – 4,5 и 4,1% соответственно. Среди заменимых аминокислот в ферменте больше всего было обнаружено аспарагиновой и глутаминовой кислоты – 22,2 и 17,1% соответственно. Следует отметить и высокое содержание в кератинрасщепляющей протеиназе глицина – 5,2%. Эта уникальная аминокислота ферментной молекулы метаболически связана с химическими компонентами организма в большей степени, чем любая другая аминокислота. Глицин в ряде синтезов может выполнять уникальные функции, в частности, в образовании белков, пуриновых нуклеотидов, глутатиона и т.д.

Молекулярную массу ферментов *Str. chromogenes* s.g. 0832 определяли методом гель – проникающей хроматографии через сефадекс G-100 [123]. Установлено, что соотношение объема элюэнта, необходимого для выноса

исследуемого белка из колонки (V_r – объем элюэнта) и объема элюата, размещающегося в свободном (не занятом гранулами сефадекса) пространстве колонки (V_o – свободный объем), обратно пропорционально величине молекулярной массы белка. Для расчета использовали формулу

$$\lg M = 5,941 - 0,847 V_r / V_o, \quad (4.1).$$

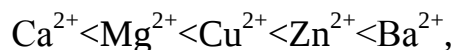
Молекулярная масса кератиназы оказалась равной 28757, протеиназы – 10846.

Таблица 4.3 Аминокислотный состав кератиназы

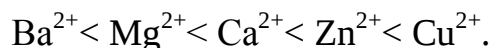
Название аминокислоты	% к общему количеству аминокислот
Аспарагиновая кислота	22,2
Треонин	9,2
Серин	9,1
Глутаминовая кислота	17,1
Пролин	4,3
Глицин	5,2
Аланин	4,5
Валин	2,7
Метионин	1,3
Изолейцин	1,7
Лейцин	4,1
Тирозин	3,6
Фенилаланин	2,5
Гистидин	2,4
Лизин	4,5
Аргинин	5,2
Сумма аминокислот	99,7
Сумма незаменимых аминокислот	33,6

4.4 Влияние активаторов и ингибиторов на активность кератиназы и протеиназы *Str. chromogenes* s.g. 0832

Действие большинства ферментов можно подавить или усилить определенными химическими реагентами [150]. Было интересно выяснить, как воздействуют ионы металлов, а также некоторые другие вещества на активность кератиназы и протеиназы *Str. chromogenes* s.g. 0832. Влияние активаторов и ингибиторов на протеолитическую и кератиназную активности определяли при 40°C. Испытуемые вещества вносили в концентрации $0,5 \cdot 10^{-3}$ М. Остаточную активность выражали в процентах по отношению к контрольным пробам, не содержащим этих веществ. Результаты, представленные в таблице 4.4, позволяют судить о том, что ионы Na^+ , K^+ , активируют протеиназу и кератиназу. Влияние ионов двухвалентных металлов на кератиназную активность можно расположить в порядке усиления ингибирующего эффекта в следующий ряд



на протеолитическую активность - соответственно



Под действием трехвалентных металлов Fe^{3+} , Cr^{3+} и Al^{3+} протеолитическая активность снижается очень существенно: 0,8; 1 и 4% соответственно, кератиназная активность тоже падает: 18; 29 и 60% соответственно.

Из специфических реагентов применяли п-хлормеркурибензоат (п-ХМБ) (ингибитор тиоловых протеаз) и ЭДТА (ингибитор металлопротеаз), а также мочевины. При взаимодействии с п-ХМБ сохранялось 100% ПА и 63% КА, ЭДТА ингибировал полностью ферменты. Мочевина полностью ингибировала протеиназу и активировала кератиназу. Эти исследования в некоторой степени совпадают со свойствами ферментов *Actinomyces fradiae* 0072, изучаемых А.П. Кашкиным в соавторстве [113,114].

Таблица 4.4 Влияние активаторов и ингибиторов на активность кератиназы и протеиназы *Str. chromogenes s.g. 0832*

Химический реагент $C=0,5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$	Ферментативная активность, % от исходного	
	ПА	КА
Контроль	100	100
Na^+	108	122
K^+	105	134
Mg^{2+}	115	5
Ba^{2+}	119	0
Ca^{2+}	100	500
Zn^{2+}	53	30
Cu^{2+}	8	54
Al^{3+}	4	60
Cr^{3+}	1	29
Fe^{3+}	0,8	18
П-ХМБ	100	63
ЭДТА	0	0
Мочевина	0	110

Из вышеизложенного можно сделать вывод, что ферменты *Str. chromogenes s.g. 0832* относятся к металлопротеиназам, кератиназа проявляет свойства тиол-зависимой протеиназы, активируемой ионами кальция [93,265,275].

4.5 Кислотная и термическая инаktivация протеиназы и кератиназы *Str. chromogenes s.g. 0832*

Характеристикой процесса инаktivации является константа скорости инаktivации ($K, \text{ч}^{-1}$), характеризующая потерю активности, приходящуюся на единицу активности фермента в течение часа [85]. Однако, несмотря на сложность перехода нативного фермента в инаktivированное состояние этот процесс для большинства ферментов является реакцией первого порядка [95,191]. Реакция первого порядка описывается уравнением

$$K = (2,303 / \tau) \lg[E_0] / [E], \quad (4.2)$$

где K – константа скорости инактивации, ч^{-1} , E_0 – исходная активность; E – активность в момент t .

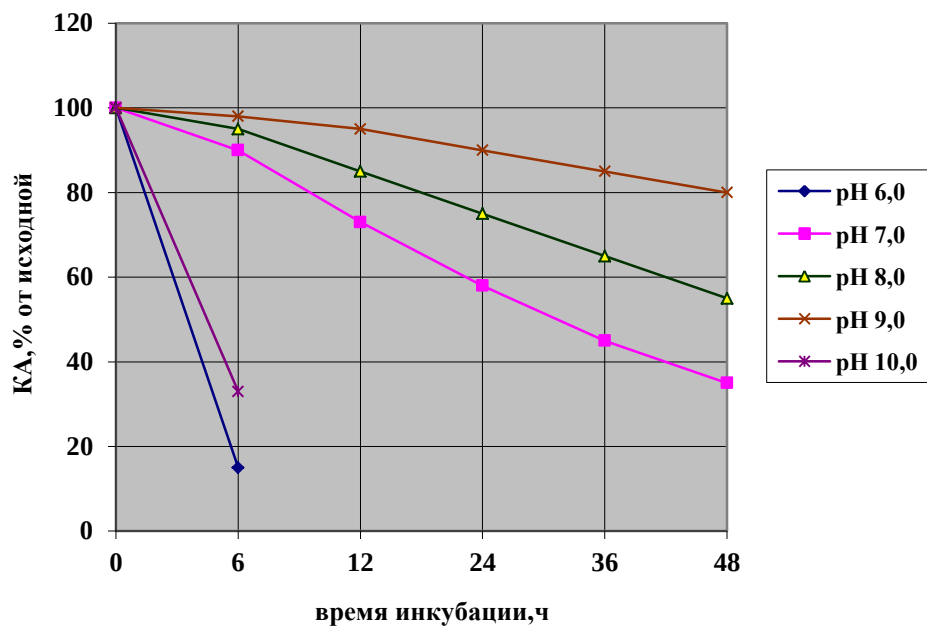
Изучение кислотной и термической инактивации проводили при pH: 6,0; 7,0; 8,0; 9,0 и 10,0 и температурах 30; 40; 50 и 60⁰С. Кинетические данные о влиянии концентрации H^+ - ионов на инактивацию кератиназы и протеиназы при температуре 30⁰С представлены в таблице 4.5. Кислотная инактивация протеиназы и кератиназы *Str. chromogenes* s.g. 0832 – типичная реакция первого порядка. Константы скорости инактивации при соответствующих pH близки между собой. В интервале pH=7,0–9,0 кератиназа менее чувствительна к действию H^+ - ионов, чем протеиназа. Величина кератиназы на порядок меньше таковой для протеиназы. Инактивация кератиназы имеет место лишь в более кислой и щелочной среде (pH =6,0 и pH =10,0). Так при pH =6,0 к 12 часам сохраняется 38% активности, а при pH =10,0 – 44% активности, в то время как при pH =7,0; 8,0 и 9,0 соответственно – 96%, 98% и 100% активности.

Таблица 4.5 Кинетическая характеристика кислотной инактивации ферментов *Str. chromogenes* s.g. 0832 при температуре 30⁰С

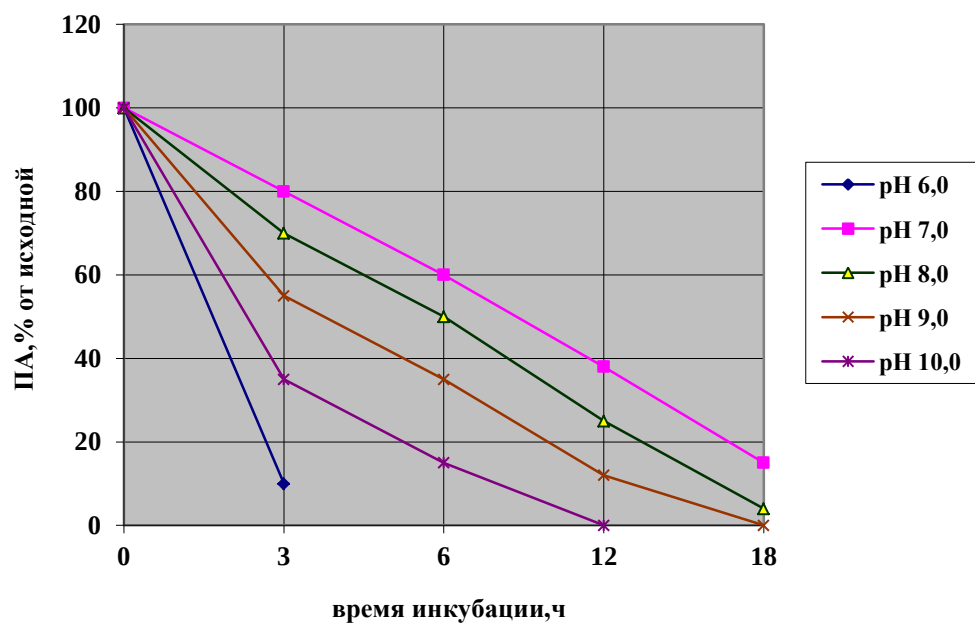
	pH =6,0		pH =7,0		pH =8,0		pH =9,0		pH =10,0	
	E, %	K, ч^{-1}	E, %	K, ч^{-1}	E, %	K, ч^{-1}	E, %	K, ч^{-1}	E, %	K, ч^{-1}
Кератиназа										
0	100	-	100	-	100	-	100	-	100	-
12	38,1	0,0800	95,7	0,0037	98,3	0,0028	100	-	43,7	0,0696
24	12,4	0,0869	90,5	0,0041	94,1	0,0025	95,5	0,0019	20,4	0,0663
36	5,8	0,0791	88,1	0,0035	91,1	0,0026	92,8	0,0021	9,9	0,0643
48	2,4	0,0777	84,2	0,0036	89,5	0,0023	90,5	0,0021	3,5	0,0699
Протеиназа										
0	100	-	100	-	100	-	100	-	100	-
12	56,7	0,0480	69,0	0,0307	65,3	0,0355	60,1	0,0422	56,2	0,0480
24	35,2	0,0435	45,7	0,0326	47,2	0,0313	38,5	0,0398	32,1	0,0474
36	21,8	0,0423	33,5	0,0304	32,1	0,0316	24,1	0,0395	21,9	0,0422
48	12,5	0,0433	24,6	0,0292	22,8	0,0308	14,7	0,0400	10,5	0,0470

Повышение температуры во всех случаях приводило к быстрой инактивации ферментов. Кератиназа стабильнее протеиназы в зоне $\text{pH} = 7,0\text{--}9,0$ при температуре 40°C (рис.4.8). Так, при $\text{pH} = 9,0$, к 12 часам инкубации сохраняется 95% кератиназной активности и 15% протеолитической активности, при $\text{pH} = 7,0$ – 73% кератиназной активности и 35% протеолитической активности.

При величине $\text{pH} = 6,0$ и $\text{pH} = 10,0$ и кератиназа, и протеиназа очень неустойчивы. На рисунке 4.9 показана инактивация кератиназы и протеиназы *Str. chromogenes* s.g. 0832 при 50°C . Процесс инактивации в этих условиях протекает также как при 30 и 40°C , но гораздо быстрее. Так уже через 1 час после инкубации при $\text{pH} = 10,0$ кератиназная активность падает в 1,6 раза от исходной, протеолитическая – в 10 раз, при $\text{pH} = 9,0$ сохраняется 90% кератиназной и 18% протеолитической активности, при $\text{pH} = 8,0$ – соответственно 80% и 30%, при $\text{pH} = 7,0$ – 70% и 57%, при $\text{pH} = 6,0$ сохраняется 54% кератиназной активности, а протеиназа инактивируется полностью.

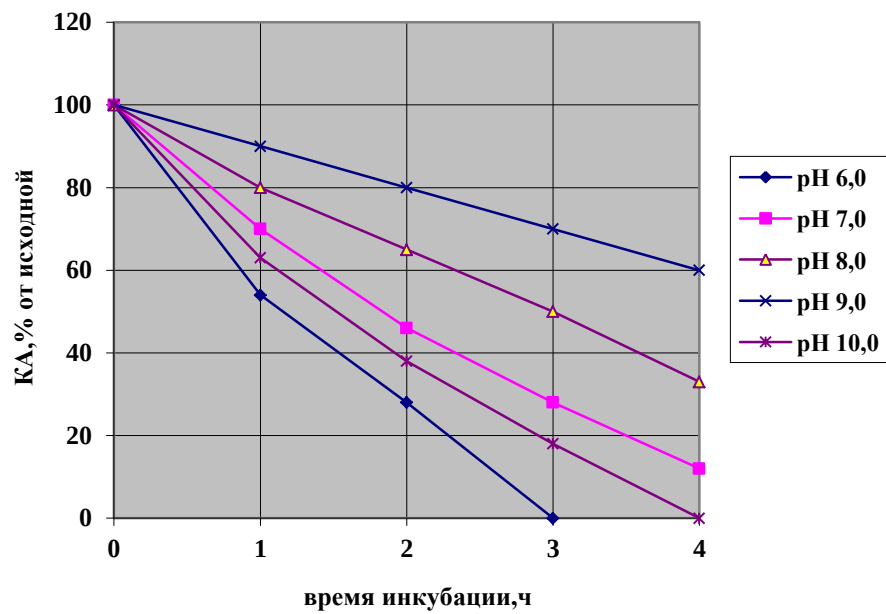


А

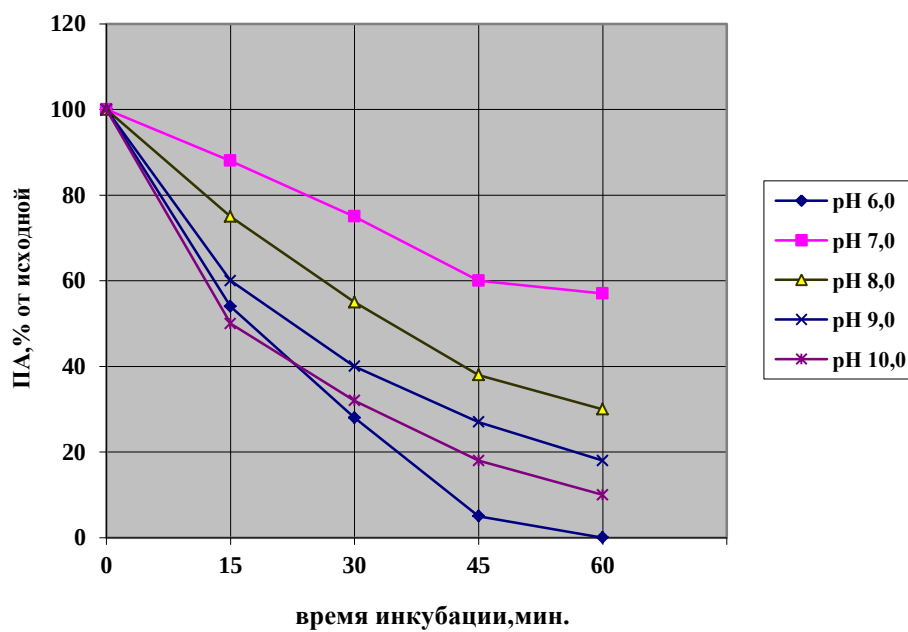


Б

Рисунок 4.8 Кинетика инактивации кератиназы (А) и протеиназы (Б) *Str. chromogenes* s.g. 0832 при 40⁰С

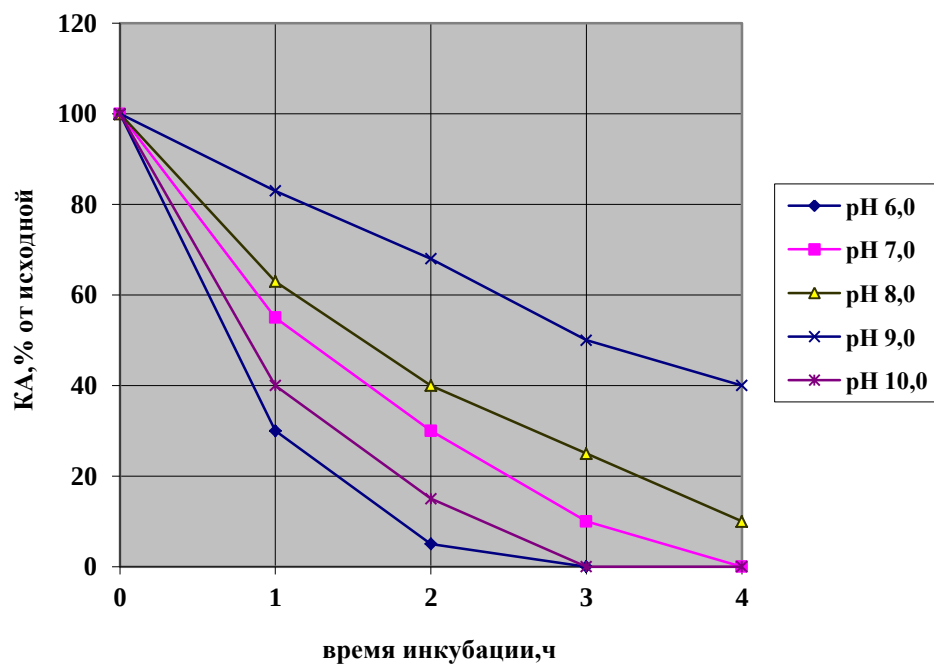


А

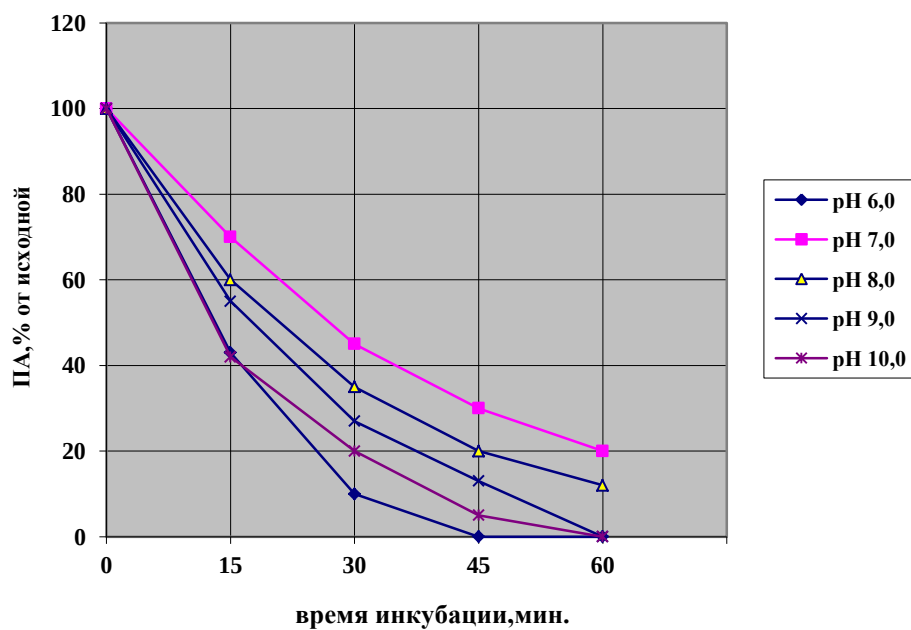


Б

Рисунок 4.9 Кинетика инактивации кератиназы (А) и протеиназы (Б) *Str. chromogenes* s.g. 0832 при 50⁰С



А



Б

Рисунок 4.10 Кинетика инактивации кератиназы (А) и протеиназы (Б)
Str. chromogenes s.g. 0832 при 60°C

Повышение температуры до 60⁰С приводит к еще более резкой инактивации ферментов (рис. 4.10). Следует заметить, что кератиназная активность через 3 часа инкубации при pH = 9,0 снижается только на 50%, а протеиназа при всех значениях pH через 1 час инактивирует полностью.

Таким образом, кератиназа *Str. chromogenes* s.g. 0832 довольно стабильна в области pH = 7,0 – 9,0 и в интервале температур 30–60⁰С, протеиназа *Str. chromogenes* s.g. 0832 также стабильна в этой зоне pH, но температурный интервал стабильности сокращается до 30–40⁰С.

Исследование термической инактивации ферментов *Str. chromogenes* s.g. 0832 при различных значениях pH позволили нам рассчитать константы инактивации для температур 30, 40, 50 и 60⁰С и термодинамические параметры этого процесса.

Поскольку инактивация в условиях наших опытов была необратимой, определить ее истинные термодинамические параметры – энтальпию ΔH , свободную энергию ΔF , энтропию ΔS – невозможно. Но воспользовавшись теорией абсолютных скоростей реакции, мы можем дать термодинамическую характеристику процесса инактивации, определив важнейшие параметры активированного комплекса $\Delta H^\ddagger$, $\Delta F^\ddagger$, $\Delta S^\ddagger$ [95].

Согласно этой теории константа скорости инактивации может быть выражена уравнением

$$K = k T / h K^\ddagger, \quad (4.3)$$

где $K^\ddagger$ - константа равновесия;

k – постоянная Больцмана, равная $1,3805 \cdot 10^{-23}$ Дж/⁰К;

T – абсолютная температура, ⁰К;

h – постоянная Планка, равная $6,626 \cdot 10^{-34}$ Дж с.

Зная величину $K^\ddagger$ можно найти ΔF :

$$\Delta F^\ddagger = - 2,303 R T \lg K^\ddagger = - 19,15 T \lg K h / k T, \quad (4.4)$$

где R – газовая постоянная, равная 8,315 Дж/⁰К моль.

Энергия активации $E_{\text{акт}}$ определяется по графикам Аррениуса из следующего соотношения:

$$E_{\text{акт}} = 2,303R \operatorname{tg} \alpha, \quad (4.5)$$

где α – угол, который составляет наклонная прямая с осью абсцисс.

Энтальпия активации $\Delta H^\ddagger$ находится по уравнению

$$\Delta H^\ddagger = E_{\text{акт}} - R T, \quad (4.6)$$

Энтропия активации $\Delta S^\ddagger$ определяем по формуле

$$\Delta S^\ddagger = \Delta H^\ddagger - \Delta F/T, \quad (4.7)$$

Результаты расчетов, представленные в таблице 4.6, позволяют сделать вывод, что для интервала температур 30–50⁰С в зоне рН =7,0–9,0 происходит разрушение водородных связей, так как n_s/n_n близко к 1 [95]. Высокую стабильность кератиназы к ионам водорода и температуре можно, видимо, объяснить тем, что в формирование белковой глобулы вносят существенный вклад какие-то иные, более прочные типы связей и взаимодействий ($n_s/n_n=0,09–0,53$). Возможно, здесь мы имеем дело с гидрофобными взаимодействиями, влияние которых на конформацию белков ослабляется только при температурах выше 50–60⁰С. Именно при этих температурах наблюдается интенсивная инактивация кератиназы.

Таблица 4.6 Термодинамическая характеристика процесса инактивации кератиназы *Str. chromogenes s.g. 0832*.

Темпера тура, °С	рН	E _{акт}	Δ H [‡]	ΔF [‡]	ΔS [‡]	n _s = ΔS [‡] /16	n _H = Δ H [‡] /6,5	n _s /n _H
		кДж·моль ⁻¹			Дж·К ⁻¹ · моль ⁻¹			
30–60	6,0	152,6	149,9	86,5	199,6	12,5	23,4	0,53
30–50	7,0	387,5	384,9	89,4	943,5	58,9	59,2	0,99
50–60	7,0	94,4	91,7	85,5	18,9	1,2	14,1	0,09
30–50	8,0	364,9	362,3	89,4	872,0	54,5	55,7	0,98
50–60	8,0	132,2	129,5	85,7	133,4	8,3	19,9	0,42
30–50	9,0	346,9	344,3	89,6	813,9	50,9	52,9	0,96
50–60	9,0	122,8	120,0	85,7	104,6	6,5	18,5	0,35
30–60	10,0	149,5	146,9	86,5	190,0	11,9	22,6	0,53

На рисунке 4.11 представлены графики $\lg K=f(1/T)$. Для растворов с рН= 6,0 и рН=10,0 зависимости Аррениуса прямолинейны по всему

интервалу температур и имеют одинаковый наклон. Это означает, что энергия активации процесса инактивации и остальные термодинамические параметры близки между собой, $n_s/n_n = 1$. Для растворов с $pH = 7,0-9,0$ зависимость $\lg K = f(1/T)$ носит более сложный характер. График зависимости $\lg K$ от $1/T$ состоит из двух отрезков прямых под углом друг к другу. Наблюдаемое резкое различие в значениях ΔH указывает на большое различие в величинах энтропии при низкой и высокой температурах. Резкий перелом графика при изменении t можно легко объяснить модификацией структуры активного центра и рассматривать как доказательство наличия зависимой от температуры конформационной гибкости фермента. Согласно этой теории отчетливый перегиб кривой может наблюдаться лишь при очень значительных различиях в величине энергии активации [85,216,322]. Наши данные хорошо вписываются в эту гипотезу.

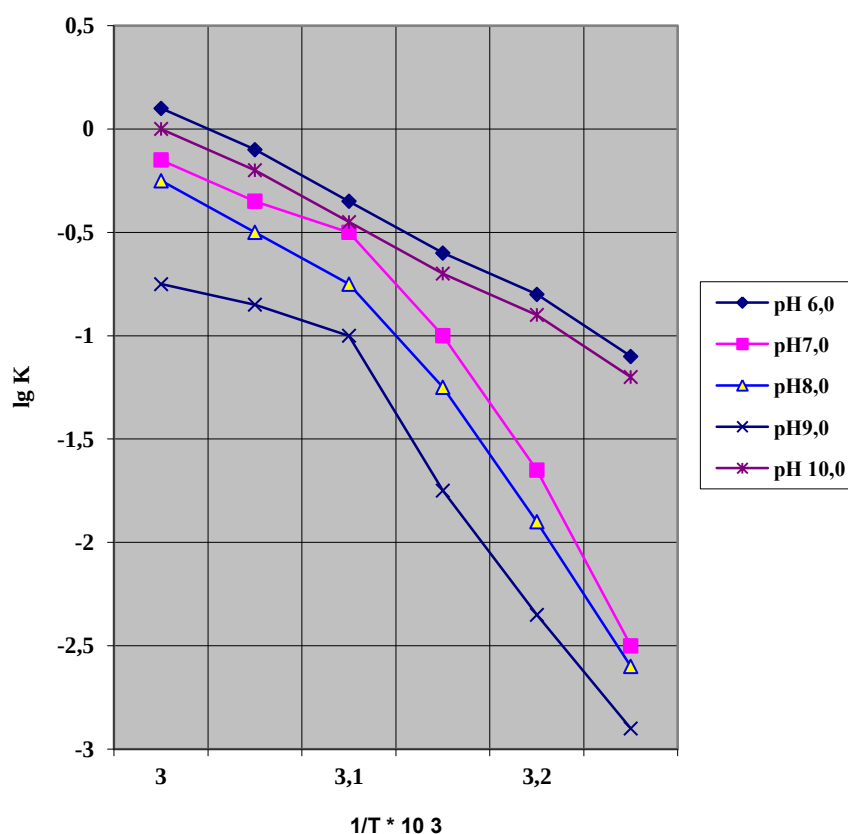


Рисунок 4.11 Графики Аррениуса $\lg K = f(1/T)$ для кератиназы *Str. chromogenes s.g. 0832*

Экспериментальные данные, представленные в таблице 4.4, свидетельствуют о том, что на кератиназную активность существенное влияние оказывает присутствие ионов Ca^{2+} . Ряд авторов [30,184.316], указывают на стабилизирующее и активирующее действие Ca^{2+} . Например, пептидазы проназы в присутствии Ca^{2+} не только восстанавливают активность, но даже активируются. Они стабильны при 70°C , а в отсутствии ионов Ca^{2+} необратимо ингибируются уже при 30°C [185,186]. Поэтому была проведена термическая и кислотная инактивация кератиназы в присутствии Ca^{2+} . Инактивацию кератиназы *Str. chromogenes* s.g. 0832 изучали в интервале температур $50\text{--}60^{\circ}\text{C}$ и $\text{pH} = 6,0\text{--}10,0$. Предварительно было установлено, что ионы Ca^{2+} в концентрации $0,5\text{M}$ при значениях $\text{pH} = 6,0$ и $\text{pH} = 8,0$ снижали ферментативную активность на 28 и 19% соответственно (табл. 4.7).

Таблица 4.7 Влияние концентрации ионов Ca^{2+}
на кератиназную активность

Концентрация ионов Ca^{2+} , М	$\text{pH} = 6,0$	$\text{pH} = 8,0$	$\text{pH} = 9,0$
	Активность, % к исходной		
0,5	72	81	103
$0,5 \cdot 10^{-1}$	88	96	121
$0,5 \cdot 10^{-2}$	115	150	196
$0,5 \cdot 10^{-3}$	377	465	546
$0,5 \cdot 10^{-4}$	150	208	271
$0,5 \cdot 10^{-5}$	100	100	100

Вероятно, ионы металла в таком количестве, при $\text{pH} = 6,0$ и $\text{pH} = 8,0$ отрицательно влияют на активный центр и делают невозможным взаимодействие фермента с субстратом. Уменьшение концентрации Ca^{2+} -ионов до $0,5 \cdot 10^{-2}\text{--}0,5 \cdot 10^{-3}$ М приводит к повышению кератиназной активности. Дальнейшее уменьшение количества ионов Ca^{2+} не влияет на активность кератиназы. Было установлено, что ионы Ca^{2+} оказывают на кератиназу не только активирующее действие, но и стабилизируют фермент

при воздействии на него pH и температуры. Исследование влияния Ca^{2+} -ионов в количестве $0,5 \cdot 10^{-3}$ М на кислотную и термическую инактивацию фермента представлено в таблице 4.8. Так при pH= 6,0; 7,0 и 10,0 присутствие кальция в среде увеличивало стабильность фермента в 2–5 раз по сравнению с контролем.

Таблица 4.8 Термическая инактивация кератиназы
Str. chromogenes s.g. 0832

Температура, °C	$K \cdot 10^{-2}, \text{ч}^{-1}$					
	pH =6,0		pH =7,0		pH =10,0	
	контроль	Ca^{2+}	контроль	Ca^{2+}	контроль	Ca^{2+}
50	61,05	12,84	34,99	19,87	46,32	10,88
60	136,99	35,71	62,91	30,35	104,62	26,95

При изучении термостабильности кератиназы в присутствии ионов Ca^{2+} в концентрации $0,5 \cdot 10^{-3}$ М фермент также был довольно устойчив (табл.4.8) и скорость инактивации фермента при 50°C составила 21–56,8%, при 60°C – 25,8–48,2% в сравнении с контролем .

Изучение физико-химических свойств комплексного препарата кератинрасщепляющей протеиназы *Str. chromogenes s.g. 0832* показало, что максимальная активность проявляется при pH =8,0 и температуре 40°C. Следует отметить, что по протеолитической активности ферментный препарат был менее кислото- и термоустойчив.

Очистка ферментов *Str. chromogenes s.g. 0832*, его электрофоретические исследования позволили получить две протеолитические фракции, одна из которых (фракция 1) имеет высокую удельную кератиназную активность (233 ед/мг белка); другая (фракция 2) обладает только протеолитической активностью и неспецифична к кератину.

Установлено, что обе фракции проявляют свойства металлопротеиназ,

так как ингибируются ЭДТА, кератиназа проявляет свойства тиол-зависимой протеиназы, активируемой ионами кальция [32].

Таким образом, исследование физико-химических свойств ферментов *Str. chromogenes* s.g. 0832 позволит проводить очистку сточных вод мясокомбинатов с учетом выявленных особенностей. Предлагаемый микроорганизм проявляет специфическую протеолитическую активность (стоки мясокомбинатов содержат труднорастворимые фибрилярные белки). Благодаря наличию специфичных протеиназ в ферментативном комплексе актиномицета *Str. chromogenes* s.g. 0832 повышается возможность гидролиза труднорастворимых белковых фракций и общий эффект очистки значительно увеличится.

5 СОРБЦИОННЫЕ СВОЙСТВА КЛЕТОК *STR. CHROMOGENES* S.G. 0832 И ЕГО ФЕРМЕНТНЫХ СИСТЕМ

5.1 Сорбционные свойства *Streptomyces chromogenes* s.g 0832

по отношению к белкам сточных вод мясной промышленности

Несмотря на широкое применение в очистке сточных вод традиционных коагулянтов: сульфатов и хлоридов железа (Fe^{2+} , Fe^{3+}), алюминия (Al^{3+}), в последнее время особый интерес проявляется к флокулянтам, которые не только снижают дозы вышеназванных коагулянтов, но и начинают завоевывать рынок, как самостоятельные вещества в очистке сточных вод. Многие страны Запада применяют их уже более 80 лет [65,100,238].

Развитие биотехнологии позволило создать новое направление в производстве флокулянтов, а именно, использование биофлокулянтов [240].

Для выяснения сорбционных характеристик *Streptomyces chromogenes* s.g. 0832 были проведены исследования сорбции белков, характерных для сточных вод мясной промышленности, и ионов железа (II),(III). Сорбционные свойства *Streptomyces chromogenes* s.g 0832 изучали в статическом режиме при комнатной температуре.

Исследование сорбционной емкости клеток актиномицета проводили следующим образом: 3 см³ культуральной жидкости, что соответствует 4 мг ($m = \rho \cdot V = 1260 \cdot 0,003 = 0,004$ г), помещали в конические колбы и добавляли 100 см³ раствора белка концентрацией 1000 мг/дм³. Содержимое оставляли в контакте на 1,5 часа при периодическом перемешивании, после чего твердую фазу отделяли декантацией, определяли содержание в нем остаточного белка. Для изучения сорбционных характеристик актиномицета были взяты белки: миоглобин, гемоглобин (Н-2509), коллаген и кератин (предварительно обработанный [42]), так как большая часть жидких систем

мясоперерабатывающей промышленности обогащена белковыми веществами и компонентами их расщепления.

Следует обратить внимание на то, что, процесс сорбции лучше протекал с коллагеном и кератином (фибрилярными белками). Хотя известно, что глобулярные белки подвергаются лучшему адсорбционному взаимодействию. Они обладают ярко выраженной поверхностной активностью, которая проявляется при попадании макромолекулы на границу раздела фаз [107,192]. Конформационное строение белковой молекулы представляет собой зигзагообразные полипептидные цепи с чередующимися и направленными в разные стороны полярными и неполярными боковыми цепями. При повороте отдельных звеньев полипептидной цепи такая молекула принимает конформацию спирали, в которой гидрофобные боковые цепи сближаются и образуют ядро глобулы [126]. В этом случае ионогенные гидрофильные группы будут обращены к полярной среде – воде, образуя гидрофильную поверхность глобулы. В таком состоянии белковая молекула характеризуется наибольшей растворимостью, так как гидрофобное ядро глобулы не соприкасается с водой, будучи закрыто гидрофильной оболочкой [215]. Полипептидные цепи имеют возможность разворачиваться частично или полностью, и тогда гидрофобные боковые группы получают возможность соприкасаться с водой, растворимость молекулы снижается. Такое разворачивание глобулы, которое отвечает состоянию «денатурации», характерно для изоэлектрического состояния многих белков [173].

Изменение конформационной структуры белковой молекулы от глобулярного состояния до развернутого (денатурированного) наблюдается при перемещении молекулы из объема раствора к границе фазового раздела [208].

Следует отметить, что в физикохимии поверхностных явлений установлено, что свойства белковых молекул во внутренних слоях и на поверхности раздела фаз не идентичны в силу различных молекулярных воздействий со стороны соседних молекул [106]. Причем в поверхностном

слое будут накапливаться молекулы вещества, от прибавления которого уменьшается поверхностное натяжение раствора и тем самым понижается общий изобарный потенциал системы [107], т.е. происходит самопроизвольный адсорбционный процесс. Имеются данные [191] исследований адсорбции протеинов (желатина, яичного альбумина, казеина и оксигемоглобина) на коллоидных пленках, которые свидетельствуют о том, что процесс образования поверхностного слоя на границе фазового раздела хорошо подчиняется уравнению классической изотермы адсорбции, при этом количество белка растет быстрее при увеличении его концентрации в растворе.

В технической литературе нет единого мнения об адсорбционном отложении веществ на фазовых границах. В настоящее время наиболее приемлемы три точки зрения на этот процесс. Согласно теории мономолекулярной адсорбции на твердых телах, предложенной Ленгмюром, на поверхности адсорбента имеются активные центры (пики, возвышения), на которых происходит адсорбция молекул адсорбтива. Это объясняется большой ненасыщенностью силового поля около таких пиков, что и приводит к закреплению на них адсорбирующихся молекул. Сорбированные молекулы находятся в непосредственном контакте с молекулами поверхности твердого тела и образуют мономолекулярные слои[54].

При этом, действие адсорбционных сил уменьшается по мере удаления от поверхности и на некотором расстоянии практически становится равным нулю. Таким образом, в процессе адсорбции, молекулы, находящиеся ближе к поверхности адсорбента, в первую очередь закрепляются на его поверхности и сами становятся как бы новыми активными центрами, но с более низким адсорбционным потенциалом. Происходит заполнение молекулами адсорбтива адсорбционного объема, при этом прочность закрепления слоев уменьшается пропорционально удалению от поверхности адсорбента[54].

Установлено [107,149,192], что в момент образования границы раздела фаз (в нашем случае контакт белкового раствора с поверхностью микроорганизма) белковые молекулы, находящиеся непосредственно на границе, закрепляются на ней за счет адсорбционных сил. Эти же силы, воздействуя на молекулы, находящиеся вблизи от границы, определяют их диффузию к поверхности раздела. Таким образом, заполняются свободные места на поверхности, и образуется мономолекулярный слой. Формирование монослоя происходит во времени и обусловлено сложностью физико-химических взаимодействий белка и поверхности раздела фаз. При адсорбции белка происходят конформационные изменения структуры молекулы, т.е. происходит частичная или полная «денатурация» белка [107,192]. Они разворачивают свои пептидные цепи и образуют прочные пространственные пленочные структуры («сшивание» межфазных адсорбционных слоев – МАС). Такие конформационные изменения структуры молекул белка в граничных условиях являются необратимыми, что отличает адсорбцию белков от классической адсорбции [106].

На сформировавшийся монослой адсорбируется следующий и т.д. При формировании МАС из водного раствора желатина [191] соотношения между скоростями образования мономолекулярных слоев составляют

1: 0,33 : 0,0006. Уменьшение скорости формирования объясняется удалением от основной адсорбционной поверхности. В непосредственной близости от границы фазового раздела [107] в процессе формирования МАС происходит уплотнение белковых слоев путем строгой ориентации макромолекул по отношению к граничной области. Исследователями [30,107,173,192] отмечается, что чем правильнее ориентированы макромолекулы в слое, тем прочнее он связан с поверхностью границы раздела фаз. Чем дальше находится слой от основной поверхности адсорбции, тем хуже ориентированы молекулы в слое. Удаленные от поверхности границы раздела фаз эти молекулы в меньшей степени денатурированы и как

следствие хуже связаны с адсорбционной поверхностью. Самые удаленные слои удерживаются лишь силами Ван-дер-Ваальса.

Возможно, переход коллагена и кератина в растворимую форму за счет ферментативного гидролиза *Streptomyces chromogenes* s.g 0832 позволил увеличить количество гидрофильных остатков аминокислот на поверхности белка, что в свою очередь привело к увеличению адсорбции. Для подтверждения этого предположения были проведены исследования по определению продуктов ферментативного гидролиза [51].

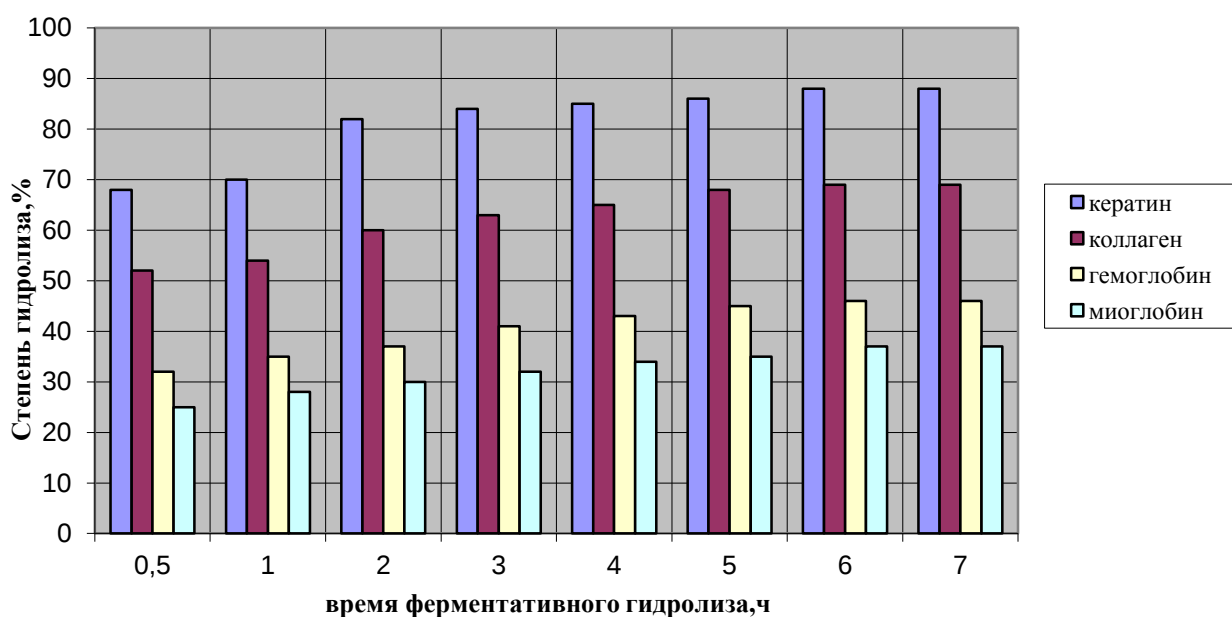


Рисунок 5.1 Зависимость степени гидролиза белков от продолжительности воздействия ферментного комплекса *Streptomyces chromogenes* s.g 0832

Влияние продолжительности ферментативного гидролиза представлено на рисунке 5.1. Интенсивное расщепление белков кератина и коллагена ферментным комплексом *Streptomyces chromogenes* s.g 0832 происходит за первый час и достигает своего наибольшего значения 88%(кератин) и 69% (коллаген) к 4–5 часам. Гемоглобин и миоглобин практически не подвергаются воздействию ферментных систем данного микроорганизма.

Следует особо подчеркнуть, что ионы Ca^{2+} являются весьма эффективными активаторами ферментного комплекса данного

микроорганизма (рис.5.2). Уже после 2-х часов гидролиза 95% белка кератина и 77% белка коллагена переходит в растворимую форму, достигая 98% и 80% соответственно к 4 часам.

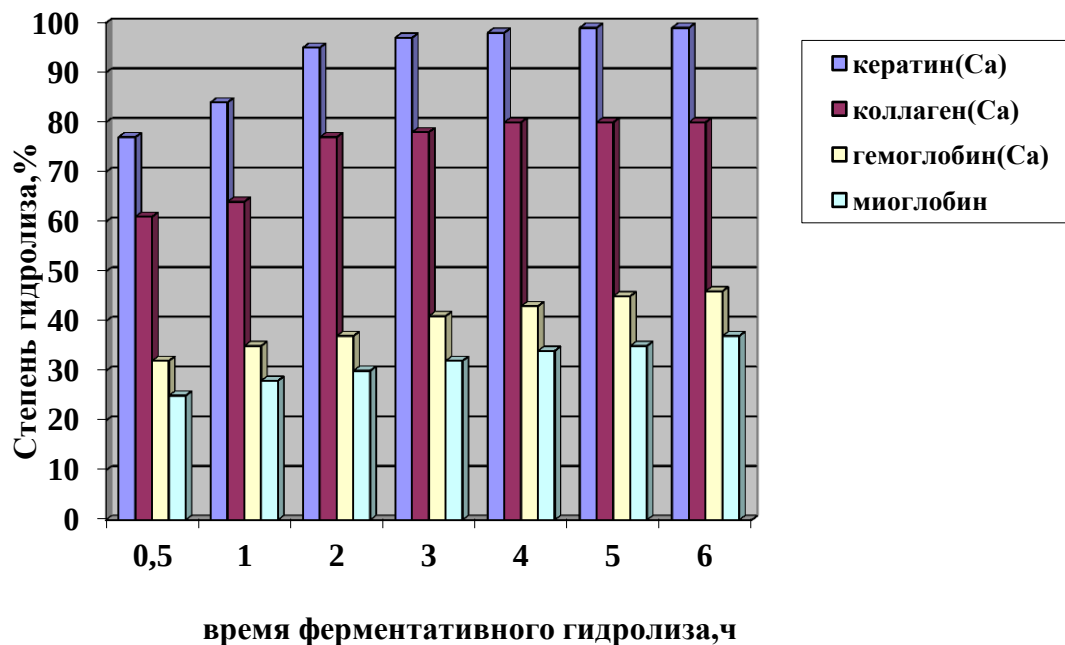


Рисунок 5.2 Зависимость степени гидролиза белков от продолжительности воздействия ферментного комплекса *Streptomyces chromogenes* s.g 0832 в присутствии ионов Ca^{2+}

Внесение в гидролизуюемую среду $0,5 \cdot 10^{-3}\text{M}$ этих ионов резко интенсифицирует процесс превращения растворимых кератина и коллагена в конечный продукт гидролиза – аминокислоты. Динамика накопления продуктов гидролиза белков кератина и коллагена представлена в таблице 5.1. В присутствии кальция содержание аминокислот в гидролизатах увеличивается в 1,5 раза в сравнении с контрольными образцами [54].

Таблица 5.1 Динамика накопления продуктов ферментативного гидролиза белков

Продолжительность гидролиза, ч	Содержание в 100 дм ³ гидролизата, %											
	Растворимый белок				пептиды				аминокислоты			
	кератин		коллаген		кератин		коллаген		кератин		коллаген	
	К*	Ca ²⁺	К	Ca ²⁺	К	Ca ²⁺	К	Ca ²⁺	К	Ca ²⁺	К	Ca ²⁺
0	4,0	4,2	4,2	4,3	1,1	1,4	0,5	0,7	0	0	0	0
0,5	18,4	4,5	30,3	26,0	3,9	1,5	6,2	4,7	56,3	82,2	42,0	57,3
1	18,7	4,7	32,4	28,4	4,5	1,8	9,3	4,4	61,3	87,1	45,3	60,2
2	20,3	4,7	35,7	30,1	4,7	2,2	2,1	2,5	61,3	88,4	46,7	62,4
3	20,3	6,1	36,3	28,5	5,4	2,4	2,1	2,0	63,0	88,6	48,1	64,5
4	19,7	5,5	35,7	24,6	5,7	3,2	6,0	7,3	65,67	88,9	49,3	65,1
5	17,5	5,1	36,8	25,3	5,7	3,6	6,7	7,5	69,9	89,0	49,5	65,2

К* - гидролиз белков без добавления ионов Ca²⁺

Проведенные исследования показали, что под действием ферментных систем *Streptomyces chromogenes* s.g 0832 происходит интенсивная деструкция белков. Аминокислотная фракция к 5 часам гидролиза составляет от 49,5 % – 69,9% в гидролизате без ионов Ca²⁺, до 65,5 – 89,0 % в их присутствии[54].

Адсорбционную емкость сорбента по отношению к каждому белку определяли по формуле:

$$A = (C_n - C_k) \cdot V / m, \quad (5.1)$$

где C_n – начальная концентрация белка в растворе, мг/дм³; C_k – конечная концентрация белка в растворе, мг/дм³; m – навеска сорбента, г; V – объем раствора белка, дм³.

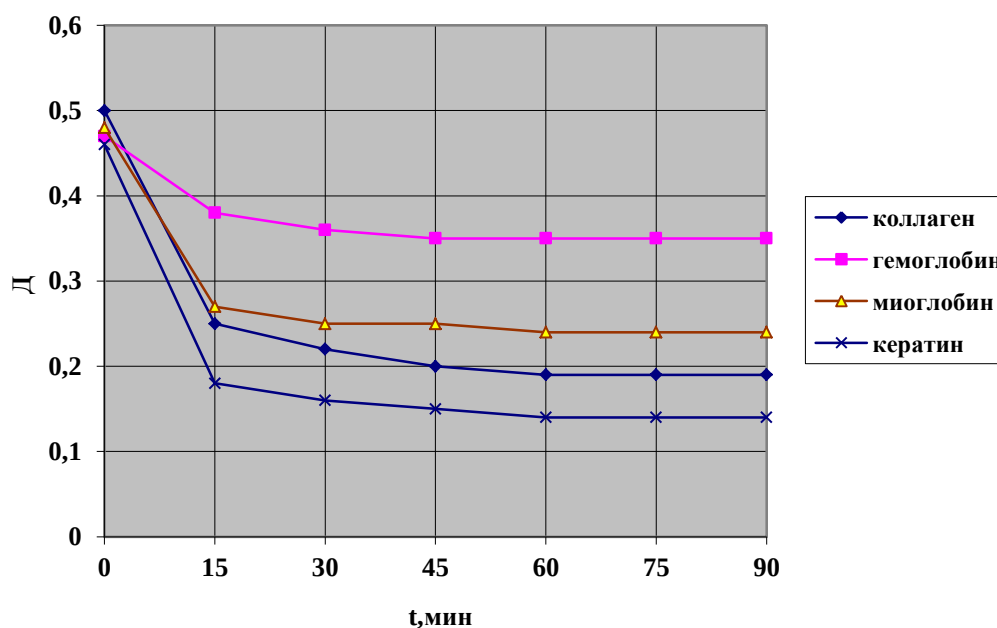


Рисунок 5.3 Изменение оптической плотности (D) от времени контакта сорбента с раствором белка

Экспериментальные исследования по оценке адсорбционной активности рассматриваемого биофлокулянта по отношению к белкам представлены на рисунке 5.3. Более эффективная сорбция протекала по отношению к кератину. Это можно объяснить специфическим взаимодействием определенных групп в структуре белка с активными центрами ферментов *Streptomyces chromogenes* s.g 0832. Менее эффективная сорбция с другими белками объясняется неспецифическим взаимодействием молекул белков с биосорбентом [54].

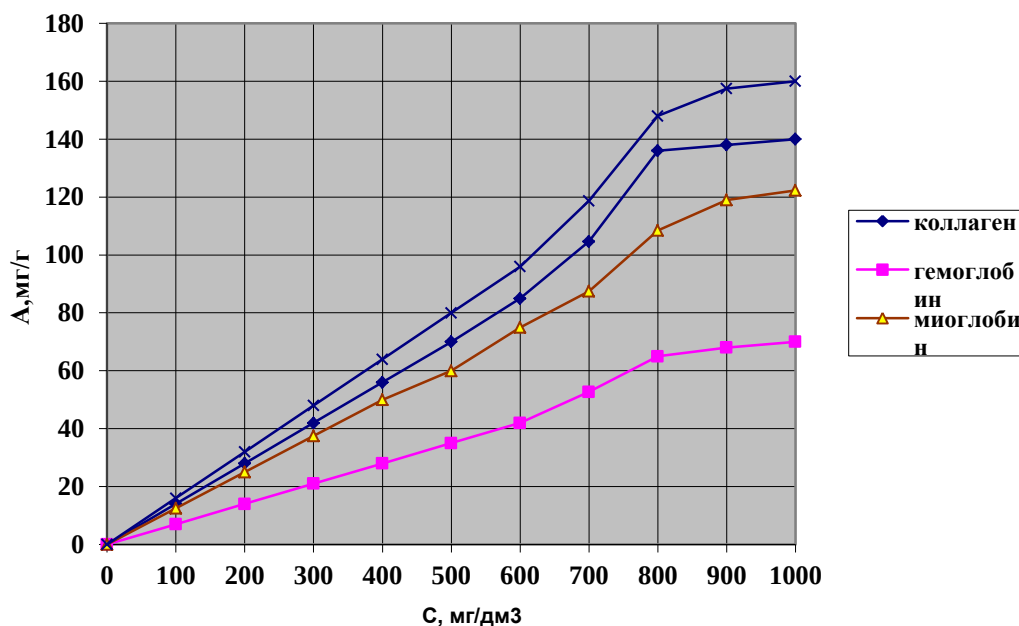


Рисунок 5.4 Изотермы сорбции белков культурой *Streptomyces chromogenes s.g 0832*.

Линеаризация изотерм сорбции (рис. 5.4) проводили по уравнению:

$$1/A = 1/A_{\infty} + [1/(A_{\infty} \cdot K) \cdot 1/C], \quad (5.2)$$

где A_{∞} – предельная величина адсорбции, мг/г; K – константа адсорбционного равновесия; C – концентрация раствора, мг/дм³.

Предельная адсорбция определяется размерами полярной группы, а адсорбированный слой при этом мономолекулярен. Отсюда можно вычислить площадь, приходящуюся на одну полярную группу в адсорбированном слое [212]

$$S = 1/(A_{\infty} \cdot N_A), \quad (5.3)$$

где N_A – число Авогадро.

Величины предельной адсорбции кератина и коллагена близки (табл.5.2) Это свидетельствует о примерно одинаковой доступности внутренней поверхности клеток актиномицета для молекул рассматриваемых белков. Адсорбция гемоглобина почти в 4 раза ниже таковой для коллагена и в 5 раз ниже, чем для кератина.

Таблица 5.2 Сорбционные характеристики *Streptomyces chromogenes* s.g 0832 по отношению к некоторым белкам

Показатели	Кератин	Гемоглобин	Миоглобин	Коллаген
Предельная адсорбция A_{∞} , мг/г	167	71,4	125	143

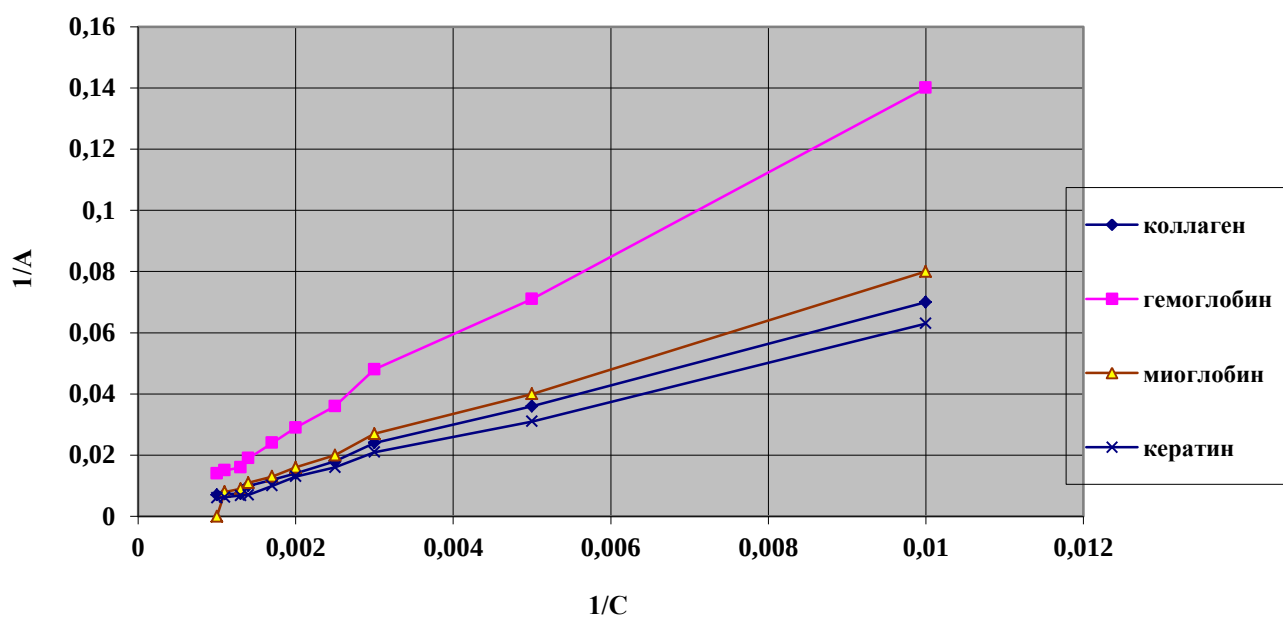


Рисунок 5.5 Линейная зависимость адсорбции от концентрации

Проведенные исследования подтвердили правильность высказанного предположения о том, что гидролиз белков ферментными системами *Streptomyces chromogenes* s.g 0832 увеличивает общее число полярных групп, которые ориентируясь в пространстве, образуют прочный адсорбционный слой. На него сорбируется следующий и т.д. В конечном итоге образуется прочный МАС за счет уплотнения белковых слоев путем строгой ориентации макромолекул по отношению к граничной области [235].

5.2 Сорбционные свойства *Streptomyces chromogenes* s.g 0832 по отношению к ионам железа

Одним из источников загрязнения водоемов, приводящих к ухудшению качества воды и нарушающих условия обитания в них гидробионтов, являются сточные воды, содержащие разбавленные растворы тяжелых металлов. В настоящее время проводится много исследований по очистке сточных вод от различных примесей. Достигнуты успехи по разработке и внедрению способов биологической очистки бытовых и других отходов. В то же время, несмотря на то, что микробиологическая трансформация и детоксикация отдельных металлов и их соединений уже достаточно полно изучена, биологическая очистка от них промышленных сточных вод находится на стадии разработки. Для извлечения металлов из растворов могут быть использованы представители различных таксономических групп. Например, клетки *Thiobacillus ferrooxidans* извлекают из раствора ионы Cd (II), Co (II), Cu (II), Cr (VI), Fe (III), мицелиальные грибы *Aspergillus* – Co (II), Ra (II) [256]. Реакция микроорганизмов на тяжелые металлы различна. Одни осуществляют их активный транспорт внутрь клеток. Эта особенность определяется ферментными системами микроорганизмов. Другие сорбируют их непосредственной поверхностью клеточной стенки или связывают слоем слизи, покрывающим клетку. В природе встречается большое количество микроорганизмов, которые адсорбируют до 30 – 40 % ионов металлов на своей поверхности [22,25,63].

При рассмотрении данного вопроса стоит отметить, что извлечение металлов из сточных вод актиномицетами практически не изучалось. Поэтому в данной работе были проведены исследования сорбционной способности актиномицета *Str. chromogenes* s. g. 0832 в отношении ионов железа. Данный микроорганизм специфичен к сточным водам мясокомбинатов, которые содержат достаточно большое количество железа 1,15 – 2,17 мг/дм³ [52].

Изучение адсорбционной способности *Str. chromogenes* s.g. 0832 по отношению к ионам железа проводили с помощью изотерм и кинетических кривых сорбции. Адсорбцию выполняли в статических условиях. В качестве адсорбатов использовали модельные растворы солей $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ и $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$. Концентрацию катионов железа контролировали стандартным перманганатометрическим методом количественного анализа. Количество сорбированных ионов рассчитывали по разнице их содержания в растворах до и после сорбции. Величину адсорбции A определяли по формуле (5.1)

Результаты исследования кинетики сорбции катионов железа биомассой актиномицета *Str. chromogenes* s.g. 0832 представлены на рисунке 5.6. Биомасса представлена частично разрушенными клетками актиномицета и содержит в основном биополимеры (около 50 % массы сухого вещества составляют белки, 10-20 % – компоненты клеточной стенки, в т.ч. полиаминосахариды, 10-20 % – РНК, 3–4 % – ДНК и приблизительно 10 % – липиды)[184]. Кроме того, биомасса содержит компоненты питательной среды.

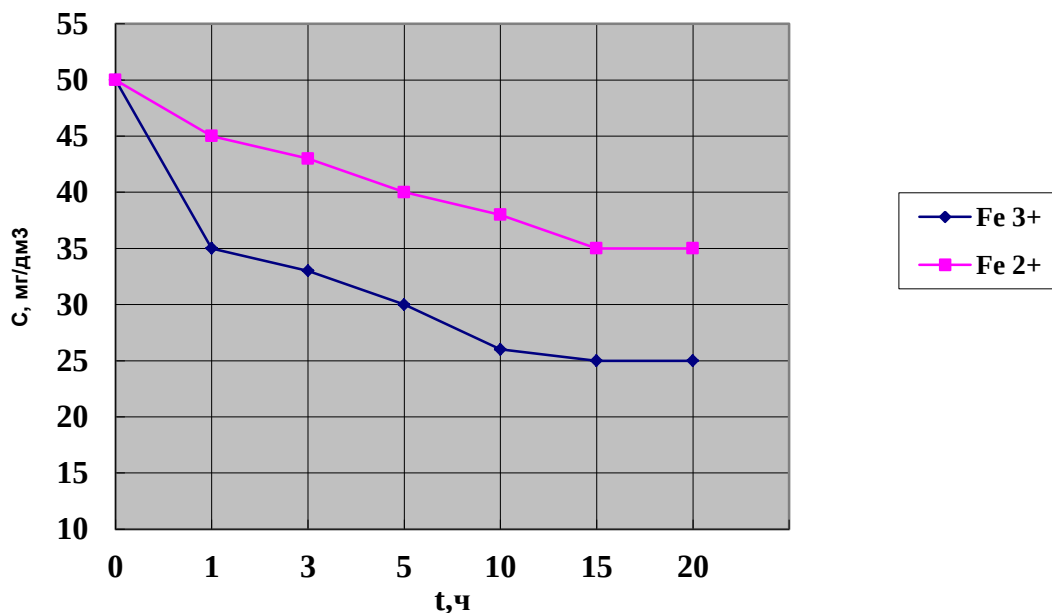


Рисунок 5.6 Кинетика сорбции катионов Fe^{3+} , Fe^{2+} биомассой *Str. chromogenes* s.g. 0832

Как видно из представленных зависимостей, максимальная скорость сорбции наблюдается в течение первого часа после внесения биофлокулянта и составляет 30 % для Fe^{3+} и 10 % – для Fe^{2+} , что подтверждает эффективность использования клеток микроорганизма *Str. chromogenes* s.g. 0832 в качестве сорбента. Высокая эффективность сорбции Fe^{3+} актиномицетом, приводит к увеличению общей массы микроорганизма, повышая плотность популяции *Str. chromogenes* s.g.. Процесс аккумуляции тяжелых металлов, в частности железа из сточных вод имеет в основе физико-химическую природу и в значительной мере обусловлен свойствами поверхностных структур клетки. В случае актиномицета он обусловлен связыванием последних мицелием (рис.5.7) [52,184].

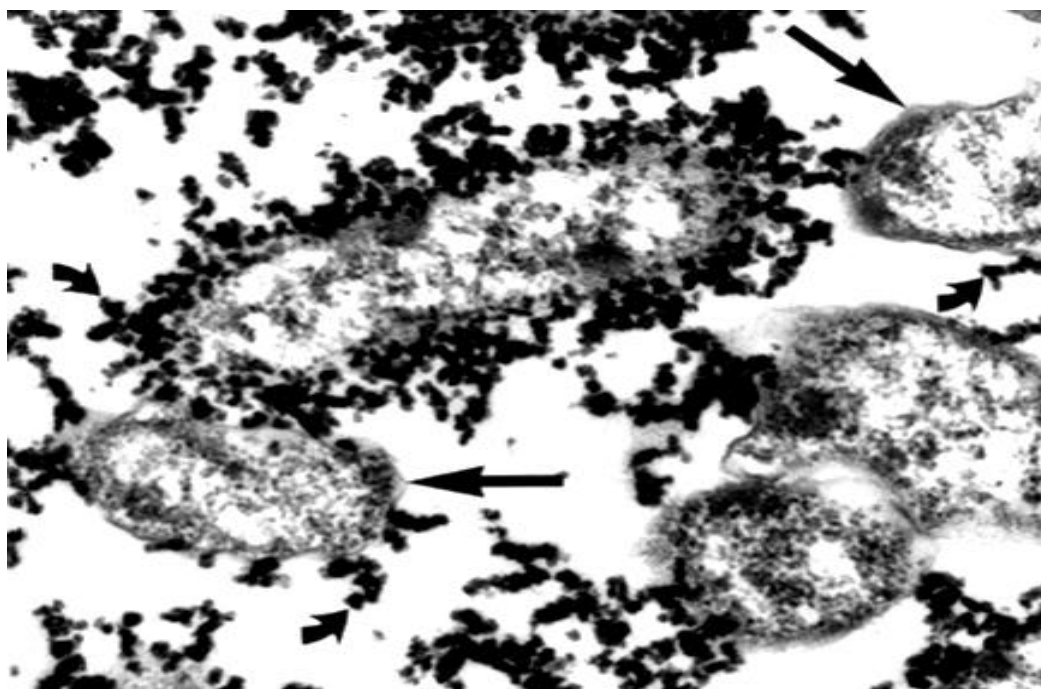


Рисунок 5.7 Процесс сорбции катионов железа клетками актиномицета *Str. chromogenes* s.g. 0832 (увеличение Ч35000)[184]

Сорбция катионов Fe^{3+} протекала более эффективно, чем сорбция катионов Fe^{2+} (рис.5.6, 5.8).

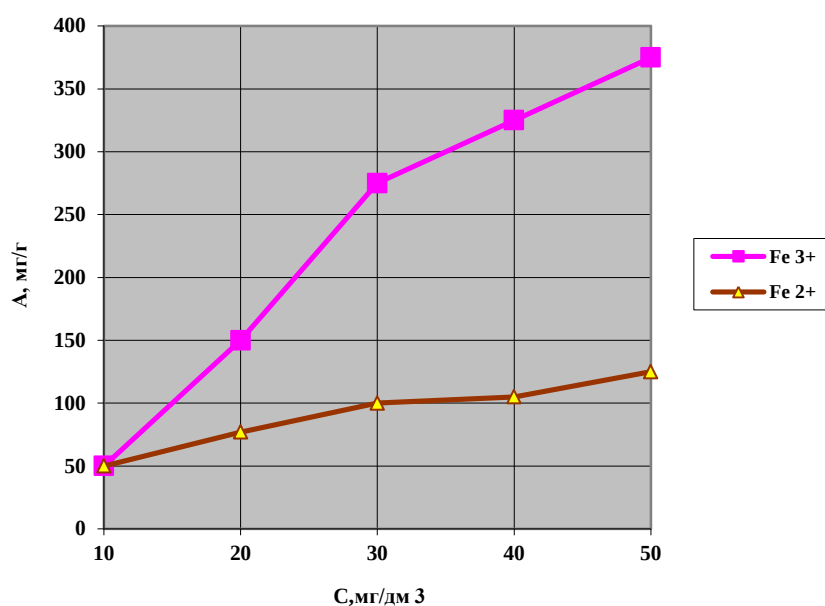


Рисунок 5.8 Изотермы сорбции катионов Fe^{3+} , Fe^{2+} биомассой *Str. chromogenes s.g. 0832*

Это подтверждают экспериментальные исследования по изучению влияния солей железа на биосинтез *Str. chromogenes s.g. 0832*. Было установлено, что внесение в среду культивирования микроорганизма Fe^{3+} повышает ферментативную активность на 32 – 34 %. Присутствие же ионов Fe^{2+} привело к снижению протеолитической активности до 0,8 % и кератиназной – до 18 % от исходной (табл. 5.3).

Таблица 5.3 Влияние ионов железа на ферментативную активность *Str. chromogenes s.g. 0832*

Химический реагент, $C = 0,5 \cdot 10^{-3} \text{M}$	Протеолитическая активность, % от исходной	Кератиназная активность, % от исходной
Контроль	100	100
Fe^{3+}	132	134
Fe^{2+}	0,8	18

На основании этих данных можно сделать следующие выводы. Более низкая сорбция ионов Fe^{2+} объясняется ингибированием ферментных систем *Str. chromogenes s.g. 0832*[82]. Соответственно высокие показатели сорбции Fe^{3+} связаны с положительным их влиянием на ферментативную активность актиномицета.

Для обработки экспериментальных данных применяли линейную форму уравнения Лэнгмюра (рис. 5.9).

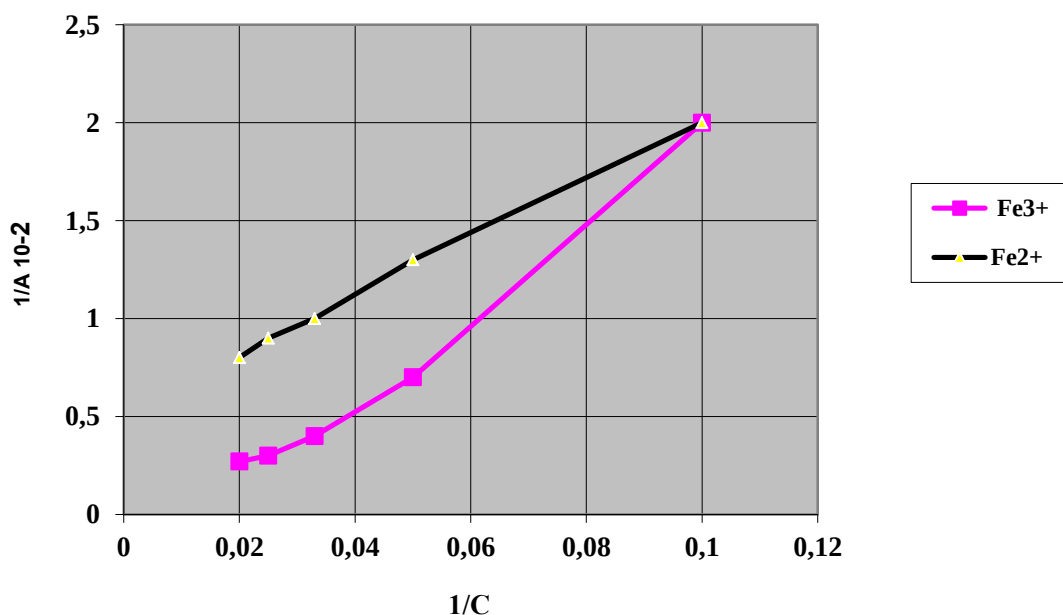


Рисунок 5.9 Линейная зависимость адсорбции ионов железа от концентрации

Сорбционные характеристики *Str. chromogenes s.g. 0832* представлены в таблице 5.4.

Таблица 5.4 Сорбционные характеристики *Streptomyces chromogenes s.g. 0832* по отношению к железу

Показатели	Fe^{3+}	Fe^{2+}
Предельная адсорбция A_{∞} , мг/г	400	133

Из данных, представленных в таблице 5.4 можно сделать вывод, что рассматриваемый микроорганизм в качестве биосорбента проявляет высокую специфичность к ионам Fe^{3+} .

Взаимодействие катионов металлов и отрицательно заряженных коллоидов стока приводит к уменьшению силы отталкивания между частицами стока и бактериальными клетками. Это приводит к сдвигу изоэлектрической точки белковых веществ и позволяет клеткам актиномицета *Str. chromogenes* s.g. 0832 выступать в качестве “мостиков” и обеспечивать эффективную сорбцию [73,181].

Результаты исследований показали, что применение биофлокулянта позволяет обеспечить очистку стока на уровне ПДК и ниже по основным показателям, характеризующим эффективность водоочистки: мутность (58,7 %), содержание общего железа (91,1 %), ХПК (91,3 %).

5.3 Сорбционные свойства *Streptomyces chromogenes* s.g 0832 по отношению к жировым составляющим сточных вод

Ранее было установлено, что в результате проведенной очистки стока наряду с уменьшением содержания всех веществ, находящихся в сточной воде, происходит значительное снижение содержания жира [51]. Это позволило предположить, что применяемый микроорганизм сорбирует белково-жировые комплексы сточных вод [169,170].

Изучение процесса очистки сточных вод от белково-жировой составляющей осуществляли в статических условиях на образцах сточных вод ОАО «комбинат мясной Воронежский». Клетки микроорганизма вносили в сток после его выращивания в глубинных условиях [19]. Концентрацию флокулянта варьировали в интервале от 1 до 5% к объему сточной воды. По данным рисунка 5.10 видно, что наилучший эффект очистки достигается при концентрации микроорганизма 2,5 %. В этом случае степень очистки

составила 95, 5% через 10 минут после внесения *Streptomyces hromogenes s.g.* 0832.

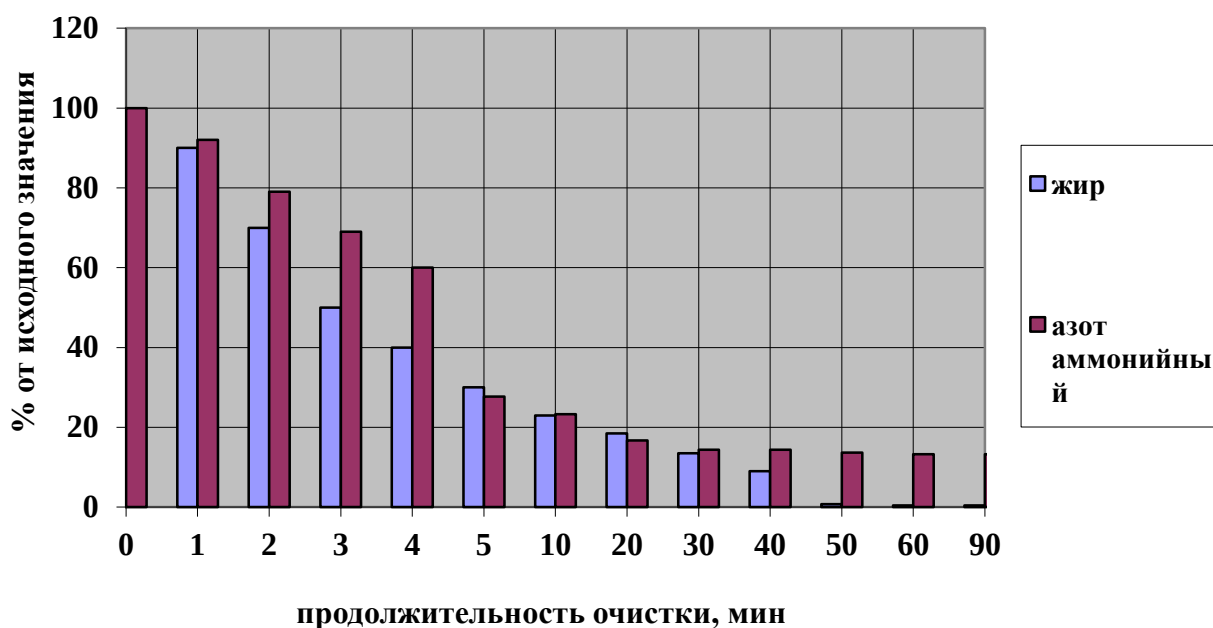


Рисунок 5.10 Зависимость степени очистки сточных вод от концентрации микроорганизма, вносимого в сток

Затем в колбу со сточной водой вносили 2,5% к объему стока культуральной жидкости микроорганизма, перемешивали, через определенные интервалы времени отфильтровывали и измеряли остаточную концентрацию загрязнений в стоке по содержанию жира[147]. По результатам, представленным на рисунке 5.11 видно, что интенсивно процесс очистки стока протекает в течение первых 10 минут. К этому времени содержание жира уменьшается от 20 мг/дм³ до 4,6 мг/дм³, белок аммонийный – от 0,9 мг/дм³ до 0,21 мг/дм³. Полученные результаты показывают, что заметное увеличение размера флокул происходит на 10 минуте процесса.

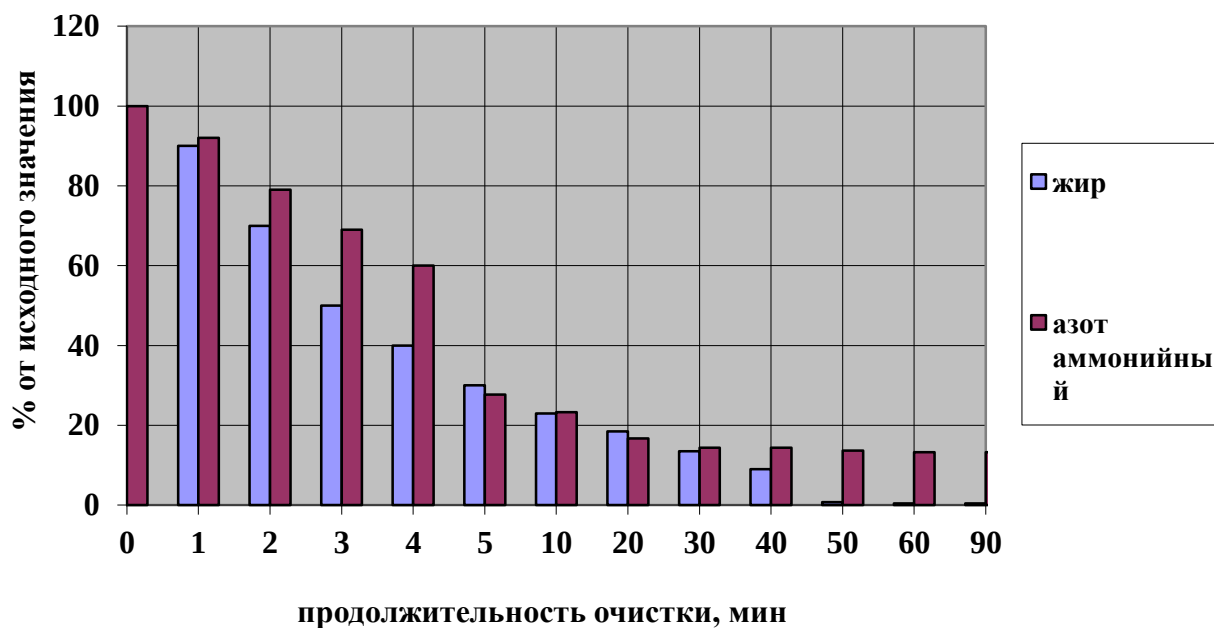


Рисунок 5.11 Очистка сточных вод от белково-жировых комплексов

В первые 5 минут размер флокул увеличивается незначительно, при этом концентрация примесей в стоке также уменьшается не столь интенсивно, как в последующие 5 минут. За это время происходит резкое снижение концентрации загрязнений в стоке (практически в 4 раза) и как следствие – укрупнение флокул (табл. 5.5).

Таблица 5.5 Изменение концентрации примесей и размера флокул в процессе очистки сточных вод

Время флокуляции, мин	Размер флокул, мкм	Концентрация примесей, мг/дм ³
0	5-10	2700
1	20	2527
2	37	2119
3	48	1989
4	54	1725

Окончание таблицы 5.5.

5	60	1367
10	115	629
20	132	536
30	150	478
40	179	367
50	218	294
60	241	200
90	241	200

Таким образом, по полученным экспериментальным данным, можно сделать вывод, что *Streptomyces hromogenes s.g. 0832* проявляет хорошие флокулирующие свойства не только по отношению к белковой составляющей стока, но и весьма эффективно удаляет из сточных вод жир, железо и может рассматриваться как флокулянт для очистки сточных вод мясной промышленности широкого спектра.

5.4 Математическое моделирование процесса биофлокуляции

Streptomyzes chromogenes s.g 0832

В качестве исходной информации для формулирования гипотезы при построении математической модели процесса очистки загрязненных сред флокуляцией рассмотрим характерное изменение размера флокул (рис.5.12).

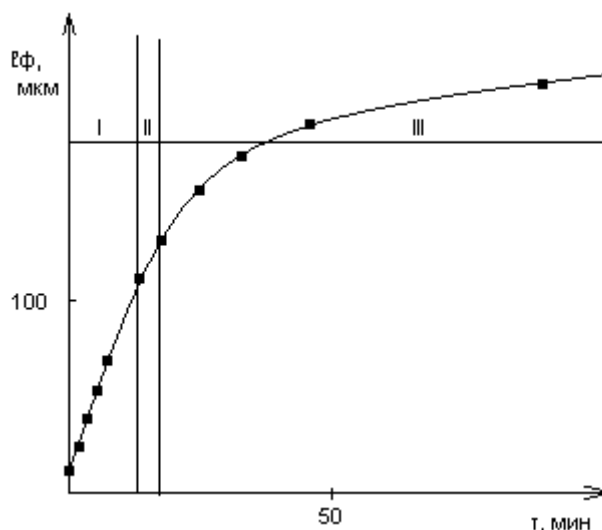


Рисунок 5.12 Кинетика изменения размеров центров флокуляции в пилотном эксперименте в объеме загрязненной среды 100 см^3 при добавлении дозы флокулянта $2,5 \text{ см}^3$ с содержанием сухих веществ $0,05\%$

Кинетику очистки можно декомпозировать на три взаимосвязанные стадии (рис.5.12). Первая стадия (I) заключается в том, что пока скорость осаждения флокул незначительна, их рост за счет аккумуляции примесей происходит в результате флокуляционного потока, который связан с адгезионными силами. По мере укрупнения частиц (стадия II) их вес возрастает, скорость осаждения увеличивается и эта скорость становится уже больше скорости флокуляционного потока, и поэтому дальнейшее укрупнение частиц происходит конвективным путем, т. е. путем захвата встречного потока примесей. Третья стадия (III) характеризуется тем, что основная масса композитных частиц флокулянт-примесь в силу большого веса находится практически в осадке и процесс флокуляции протекает через его поверхность.

Примем, что геометрически форма флокул является правильным цилиндром высотой h и радиусом r_1 . Дисперсным анализом установлено, что диапазоны изменения размеров флокул таковы: $h \in [50 - 600]$ мкм; $r_1 \in [0,2 - 2]$ мкм, причем численная функция плотности их распределения по размерам близка к равномерной. Это позволяет выбрать в качестве характеристик h и r_1 их математические ожидания как среднее, т.е. $h = 325$

мкм, $r_1 = 1,1$ мкм и определить среднеожидаемый объем репрезентативной флоккулы

$$V_\phi = \pi r_1^2 h = \pi \cdot 1,1^2 \cdot 325 = 1235 \text{ мкм}^3, \quad (5.4)$$

Откуда эффективный размер такой флоккулы есть

$$l_\phi = \sqrt[3]{V_\phi} = \sqrt[3]{1235} = 10,73 \text{ мкм}, \quad (5.5)$$

что коррелирует с экспериментальными данными. Если допустить эквизистентное увеличение флоккулы в процессе флокуляции, т.е. считать, что отношение высоты к радиусу клетки остается постоянным

$$\xi = h/r_1 = 325/1,1 = 295,45,$$

то по увеличению объема клетки очевидным образом вычисляются текущие геометрические размеры репрезентативной флоккулы из системы соотношений

$$V_\phi = \pi r_1^2 h, \quad \xi = h/r_1.$$

Сопоставим размер репрезентативного центра флокуляции со средним линейным расстоянием до ближайших центров. Т.к. согласно (5.4) и (5.5) начальный объем флоккулы и характерный её размер соответственно равны $1,235 \cdot 10^{-15} \text{ м}^3$ и $10,73 \cdot 10^{-6} \text{ м}$, а объем сухих клеток в 5 % в дозе $2,5 \text{ см}^3$ составляет

$$V_d = 0,05 \cdot 2,5 \cdot 10^{-6} = 1,25 \cdot 10^{-7} \text{ м}^3,$$

тогда число центров флокуляции будет

$$n = V_d / V_\phi = (1,25 \cdot 10^{-7}) / (1,235 \cdot 10^{-15}) \approx 10^8.$$

Пилотный объем очищаемой среды 100 см^3 , т.е.

$$V_{oc} = 100 \cdot 10^{-6} \text{ м}^3,$$

Поэтому объем среды на один центр флокуляции равен

$$V_{яч} = V_{oc} / n = (100 \cdot 10^{-6}) / 10^8 = 1000 \cdot 10^{-15} \text{ м}^3$$

или в линейном размере

$$r_2 = \sqrt[3]{V_{яч}} = \sqrt[3]{1000 \cdot 10^{-15}} = 1 \cdot 10^{-4} \text{ м} = 100 \text{ мкм}.$$

Это означает, что характерный размер центра флокуляции намного меньше свободного объема, окружающего частицу, т.е. геометрической формой центра на первой стадии можно пренебречь.

Учитывая, что плотности дисперсной среды $\rho = 1000 \text{ кг/м}^3$ и примесей $\rho_m = 1700 \text{ кг/м}^3$ близки, то скорость осаждения композитной частицы флоккула-примесь может быть рассчитана по формуле Стокса

$$u_c = [g l_\phi^2 (\rho_m - \rho)] / [18 \nu \rho] =$$

$$= [9,81 \cdot (10,73 \cdot 10^{-6})^2 \cdot (1700 - 1000)] / [18 \cdot 10^{-5} \cdot 1000] = 4,4 \cdot 10^{-6} \text{ м/с},$$

где g – ускорение свободного падения, м/с^2 ; ν – кинематическая вязкость дисперсионной среды, $\text{м}^2/\text{с}$. Справедливость применения формулы Стокса подтверждается расчетом числа Рейнольдса для максимального центра флокуляции

$$Re = (u_c l_\phi) / \nu = (2215 \cdot 10^{-6} \cdot 241 \cdot 10^{-6}) / 10^{-5} = 0,05,$$

которое меньше 1.

Проведенные оценки физической картины процесса с выдвигением гипотезы позволяет приступить к синтезу математической модели.

Согласно физической модели можно воспользоваться ячеичными представлениями, считая, что ячейка представляет собой среду радиуса r_2 (рис.5.13), заполненную загрязненной средой, с центром флокуляции r_1 . Будем рассматривать миграцию коллоидной взвеси примеси исходя из диффузионных соображений в осисиметричной постановке, т.е. их концентрация зависит только от текущего радиуса r .

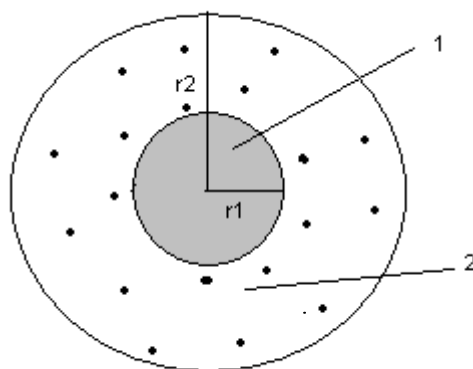


Рисунок 5.13 Схема ячейки: 1 – центр флокуляции;
2 – загрязненная среда.

Так как плотность потока вещества при конвективной диффузии имеет вид:

$$\bar{j} = \bar{u} \cdot c - D \operatorname{grad} c, \quad (5.6)$$

где $\bar{u}$ – вектор скорости движения примеси к центру флокуляции под действием адгезионных сил, м/с; c – массовая концентрация примеси, кг/м³; D – коэффициент диффузии примесей, м²/с.

Расположим начало координат в центре ячейки (рис.5.15), тогда (5.6) в компонентной форме записи таково

$$j = -uc + D \partial c / \partial r. \quad (5.7)$$

Выделим сферу радиуса r ($r_1 < r < r_2$), тогда масса примеси, проходящая через эту сферу за промежуток времени $\partial \tau$ есть

$$\partial m(r, \tau) = [-uc(r, \tau) + D \partial c(r, \tau) / \partial r] 4\pi r^2 \partial \tau. \quad (5.8)$$

Масса примеси, проходящая через сферу радиуса $(r + \partial r)$, будет

$$\partial m(r + \partial r, \tau) = [-uc(r + \partial r, \tau) + D \partial c(r + \partial r, \tau) / \partial r] 4\pi (r + \partial r)^2 \partial \tau. \quad (5.9)$$

С учетом разложения в ряд Тейлора с точностью до линейных слагаемых

$$c(r + \partial r, \tau) = c(r, \tau) + \partial c(r, \tau) \partial r / \partial r;$$

$$\partial c(r + \partial r, \tau) / \partial r = \partial c(r, \tau) / \partial r + \partial^2 c(r, \tau) \partial r / \partial r^2,$$

а также имея в виду соотношение

$$(r + \partial r)^2 = r^2 + 2r\partial r + \partial r^2 \approx r^2 + 2r\partial r,$$

выражение (5.9) можно записать так

$$\begin{aligned} \partial m(r + \partial r, \tau) = \{ & -u[c(r, \tau) + \partial c(r, \tau) \partial r / \partial r] + D[\partial c(r, \tau) / \partial r + \\ & + \partial^2 c(r, \tau) \partial r / \partial r^2] \} 4\pi r^2 \partial \tau + \{ & -u[c(r, \tau) + \partial c(r, \tau) \partial r / \partial r] + D[\partial c(r, \tau) / \partial r + \\ & + \partial^2 c(r, \tau) \partial r / \partial r^2] \} 8\pi r \partial r \partial \tau. \end{aligned} \quad (5.10)$$

За $\partial \tau$ между сферами радиуса r и $(r + \partial r)$ накопится масса примеси, равная

$$\begin{aligned} \partial m = \partial m(r + \partial r, \tau) - \partial m(r, \tau) = & [-u \partial c(r, \tau) \partial r / \partial r + D \partial^2 c(r, \tau) \partial r / \partial r^2] 4\pi r^2 \partial \tau + \\ & + \{ -u[c(r, \tau) + \partial c(r, \tau) \partial r / \partial r] + D[\partial c(r, \tau) / \partial r + \partial^2 c(r, \tau) \partial r / \partial r^2] \} 8\pi r \partial r \partial \tau. \end{aligned} \quad (5.11)$$

С другой стороны

$$\partial m = \partial v \partial m / \partial v = \partial v \partial c, \quad (5.12)$$

$$\begin{aligned} \text{где} \quad \partial v &= 4/3 \pi (r + \partial r)^3 - 4/3 \pi r^3 = 4/3 \pi [(r + \partial r)^3 - r^3] = \\ &= 4/3 \pi (r^3 + 3r^2 \partial r + 3r \partial r^2 + \partial r^3 - r^3) \approx 4/3 \pi 3r^2 \partial r = 4 \pi r^2 \partial r, \end{aligned}$$

поэтому, разделив (5.11) на $4\pi r^2 \partial r \partial \tau$ и переходя к пределу при $\partial r \rightarrow 0$, найдем

$$\partial c(r, \tau) / \partial \tau = -u \partial c(r, \tau) / \partial r - (2u/r) c(r, \tau) + D [\partial^2 c(r, \tau) / \partial r^2 + (2/r) \partial c(r, \tau) / \partial r]. \quad (5.13)$$

Уравнение (5.13) дополняется начальным условием

$$c(r, 0) = c_0 \quad (5.14)$$

и граничными условиями:

– отсутствие потока примеси через внешнюю границу ячейки

$$-u c(r_2, \tau) + D \partial c(r_2, \tau) / \partial r = 0; \quad (5.15)$$

– полное поглощение примеси на поверхности центра флуктуации

$$c(r_1, \tau) = 0. \quad (5.16)$$

Уравнение (5.13) может быть записано в более компактном виде

$$\partial(r^2 c) / \partial \tau = -u \partial(r^2 c) / \partial r + D \partial(r^2 \partial c / \partial r) / \partial r,$$

и если ввести новую зависимую переменную

$$\omega = r^2 c,$$

то система (6.13) – (6.16) в относительных переменных

$$\Omega = \omega / (c_0 r_1^2); \quad R = r / r_1; \quad \Theta = \tau u / r_1; \quad B_0 = u r_1 / D; \quad \zeta = r_2 / r_1$$

запишется следующим образом:

$$\begin{aligned} \partial \Omega(R, \Theta) / \partial \Theta = & - \partial \Omega(R, \Theta) / \partial R + B_0^{-1} [\partial^2 \Omega(R, \Theta) / \partial R^2 - 2/R \cdot \partial \Omega(R, \Theta) / \partial R + \\ & + 2/R^2 \cdot \Omega(R, \Theta)]; \end{aligned} \quad (5.17)$$

$$\Omega(R, 0) = R^2; \quad (5.18)$$

$$\Omega(\zeta, \Theta) - B_0^{-1} [-2/3 \cdot \Omega(\zeta, \Theta) + \partial \Omega(\zeta, \Theta) / \partial R] = 0; \quad (5.19)$$

$$\Omega(1, \Theta) = 0. \quad (5.20)$$

В математической модели (5.17) – (5.20) критерий Боденштейна B_0

характеризует режим миграции ($B_0 > 1$ – адгезионный; $B_0 = 1$ – смешанный;

$B_0 < 1$ – диффузионный). Учитывая, что в жидкостях коэффициент диффузии $\sim 10^{-9} \text{ м}^2/\text{с}$, то $B_0 \gg 1$ и поэтому модель может быть упрощена до вида:

$$\partial \Omega(R, \Theta) / \partial \Theta = - \partial \Omega(R, \Theta) / \partial R; \quad (5.21)$$

$$\Omega(R, 0) = R^2; \quad (5.22)$$

$$\Omega(1, \Theta) = 0. \quad (5.23)$$

Модель (5.21) – (5.23) описывает первую стадию и по существу возникает вопрос о границе: где заканчивается первая стадия, т.е. вопрос о

правомочности модели (5.21) – (5.23). Ответ на этот вопрос может быть получен из оценки размера флоккулы, для которого время осаждения по Стоксу будет существенным. Эту процедуру опишем чуть ниже, а пока перейдем к моделированию второй стадии.

По определению штучный поток центров флокуляции есть

$$j(x, \tau) = \omega[l(\tau)] n(x, \tau), \quad (5.24)$$

где $\omega[l(\tau)]$ – скорость центров флокуляции по Стоксу, м/с; $l(\tau)$ – характерный размер флоккулы, м; $n(x, \tau)$ – локальная счетная концентрация центров флокуляции, $1/\text{м}^3$. Выделим элементарный объем по высоте зоны очистки между секущими плоскостями x и $(x + \partial x)$ (рис.5.14) и рассмотрим для него штучный баланс центров флокуляции

$$\partial \bar{N} = \partial \bar{N}(x, \tau) - \partial \bar{N}(x + \partial x, \tau), \quad (5.25)$$

$$\text{где} \quad \partial \bar{N}(x, \tau) = \omega[l(\tau)] n(x, \tau) S \partial \tau; \quad (5.26)$$

$$\partial \bar{N}(x + \partial x, \tau) = \omega[l(\tau)] n(x + \partial x, \tau) S \partial \tau; \quad (5.27)$$

S – единичная площадь поперечного сечения зоны осаждения, м^2 ; тогда из (5.25) – (5.27) следует

$$\begin{aligned} \partial \bar{N} &= \omega[l(\tau)] n(x, \tau) S \partial \tau - \omega[l(\tau)] n(x + \partial x, \tau) S \partial \tau = \\ &= \omega[l(\tau)] n(x, \tau) S \partial \tau - \omega[l(\tau)] n(x, \tau) S \partial \tau - \\ &- \omega[l(\tau)] (\partial n(x, \tau) / \partial x) \partial x S \partial \tau = - \omega[l(\tau)] (\partial n(x, \tau) / \partial x) S \partial x \partial \tau. \end{aligned} \quad (5.28)$$

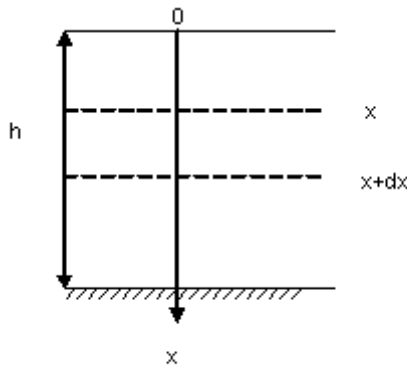


Рисунок 5.14 Расчетная схема II стадии флокуляции

Разделив (5.28) на $S \partial x \partial \tau$ и имея в виду, что $\partial n(x, \tau) = \partial \bar{N} / (S \partial x)$, получим уравнение математической модели

$$\partial n(x, \tau) / \partial \tau = - \omega[l(\tau)] \partial n(x, \tau) / \partial x, \quad (5.29)$$

которое дополняется начальным

$$n(x, 0) = n_0 \quad (5.30)$$

и граничным условиями

$$n(h, \tau) = 0 \quad (5.31)$$

Скорость по Стоксу выражается следующей формулой

$$\omega[l(\tau)] = (g l^2(\tau)(\rho_m - \rho)) / (18\gamma\rho).$$

Предположим, что $l(\tau) = a\tau + l_0$, где l_0 – характерный размер центра флокуляции в конце первой стадии процесса, a – коэффициент, подлежащий определению. Введем обозначения:

$$\omega[l(0)] = (g l_0^2(\rho_m - \rho)) / (18\gamma\rho) = \omega_0;$$

$$N(X, \Theta) = n(x, \tau) / n_0; \quad \Theta = (\tau \omega_0) / h; \quad X = x/h,$$

при этом

$$\omega[l(\tau)] / \omega_0 = (A\Theta + 1)^2,$$

где $A = ah/(l_0 \omega_0)$, тогда система (5.29) – (5.31) примет следующий вид:

$$\partial N(X, \Theta) / \partial \Theta = - (A\Theta + 1)^2 (\partial N(X, \Theta) / \partial X); \quad (5.32)$$

$$N(X, 0) = 1; \quad (5.33)$$

$$N(0, \Theta) = 0. \quad (5.34)$$

Уравнения (5.32) – (5.34) представляют собой математическую модель второй стадии.

Третья стадия характеризуется тем, что центры флокуляции с адгезированными примесями перешли в осадок, но флокуляционный поток продолжается из объема среды к поверхности осадка.

В этом случае примем диффузионные представления, записав диффузионное уравнение для системы координат, как показано на рисунке 5.15, в виде

$$\partial c(x, \tau) / \partial \tau = D \partial^2 c(x, \tau) / \partial x^2, \quad (5.35)$$

где D – коэффициент диффузии примеси в среде, $\text{м}^2/\text{с}$; $c(x, \tau)$ – локальная массовая концентрация примеси, $\text{кг}/\text{м}^3$, которое дополняется:

– начальным условием

$$c(x, \tau) = c_0, \quad (5.36)$$

– условием отсутствия диффузионного потока на свободной границе

$$\partial c(h, \tau) / \partial x = 0; \quad (5.37)$$

– кинетическим соотношением на поверхности осадка

$$D \partial c(0, \tau) / \partial x = kc(0, \tau), \quad (5.38)$$

где k – кинетический коэффициент скорости поглощения примеси осадком.

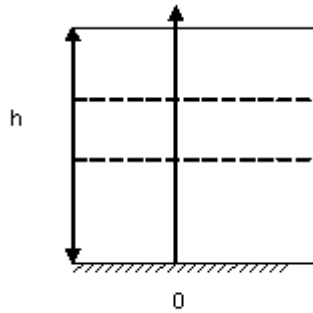


Рисунок 5.15 Расчетная схема III стадии процесса флокуляции

С помощью относительных параметров

$$\Theta = \tau D / h^2; \quad X = x / h; \quad C(X, \Theta) = c(x, \tau) / c_0; \quad K = kh / D$$

Система (5.35) – (5.38) приведена к безразмерному виду:

$$\partial C(X, \Theta) / \partial \Theta = \partial^2 C(X, \Theta) / \partial X^2; \quad (5.39)$$

$$C(X, \Theta) = 1; \quad (5.40)$$

$$\partial C(1, \Theta) / \partial X = 0; \quad (5.41)$$

$$\partial C(0, \Theta) / \partial X = KC(0, \Theta). \quad (5.42)$$

Система (5.39) – (5.42) представляет собой математическую модель третьей стадии процесса флокуляции.

Проведем анализ математической модели процесса биофлокуляции. Сначала рассмотрим математическую модель первой стадии процесса (5.21) – (5.23). Применим к системе (5.21) – (5.23) одностороннее преобразование Лапласа по переменной Θ :

$$\partial \Omega_L(R, s) / \partial R + s \Omega_L(R, s) = R^2; \quad (5.43)$$

$$\Omega_L(1, s) = 0, \quad (5.44)$$

где s, Ω_L – изображения s и Ω . Общее решение (5.43) есть:

$$\Omega_L(R, s) = \exp(-\int s \partial R) [C + \int R^2 \exp(\int s \partial R) \partial R], \quad (5.45)$$

где C – константа интегрирования. После последовательного интегрирования (5.45) запишется следующим образом

$$\Omega_L(R, s) = \exp(-sR) [C + (R^2/s) \exp(sR) - (2/s^3) \exp(sR)(sR - 1)]. \quad (5.46)$$

Подставляя (5.46) в (5.44) определим константу интегрирования

$$C = (-1/s) \exp(s) + (2/s^3) \exp(s)(s - 1). \quad (5.47)$$

Из (5.46) и (5.47) следует решение в изображениях

$$\Omega_L(R, s) = (-1/s) \exp[-(R-1)s] + (2/s^3) \exp[-(R-1)s](s-1) + R^2/s - 2/s^3(sR - 1). \quad (5.48)$$

Оригиналы от слагаемых в (5.48) таковы:

$$L^{-1} \{(-1/s) \exp[-(R-1)s]\} = -1[\Theta - (R-1)]; \quad (5.49)$$

$$L^{-1} \{(2/s^3) \exp[-(R-1)s]\} = 2[\Theta - (R-1)] 1[\Theta - (R-1)]; \quad (5.50)$$

$$L^{-1} \{(-2/s^3) \exp[-(R-1)s]\} = -2/\Gamma(3) [\Theta - (R-1)]^2 1[\Theta - (R-1)]; \quad (5.51)$$

$$L^{-1}[R^2/s] = R^2; \quad L^{-1}[-2R/s^2] = -2R\Theta; \quad L^{-1}[2/s^3] = \Theta^2, \quad (5.52)$$

где $1(\dots)$ – функция Хэвисайда.

С учетом (5.49) – (5.52) решение (5.48) в оригинале будет

$$\Omega(R, \Theta) = -1[\Theta - (R-1)] + 2[\Theta - (R-1)] \cdot 1[\Theta - (R-1)] - [\Theta - (R-1)]^2 \cdot 1[\Theta - (R-1)] + R^2 - 2R\Theta + \Theta^2,$$

которое, после несложных преобразований запишется

$$\Omega(R, \Theta) = \begin{cases} (R - \Theta)^2, & \text{при } 0 \leq \Theta \leq R-1, \\ 0, & \text{при } \Theta > R-1, \end{cases}$$

которое с учетом соотношения

$$\Omega(R, \Theta) = R^2 C(R, \Theta)$$

преобразуется к окончательному виду:

$$C(R, \Theta) = \begin{cases} (1 - \Theta/R)^2, & \text{при } 0 \leq \Theta \leq R-1, \\ 0, & \text{при } \Theta > R-1. \end{cases} \quad (5.53)$$

Характерные профили локальной концентрации примесей приведены на рисунке 5.16.

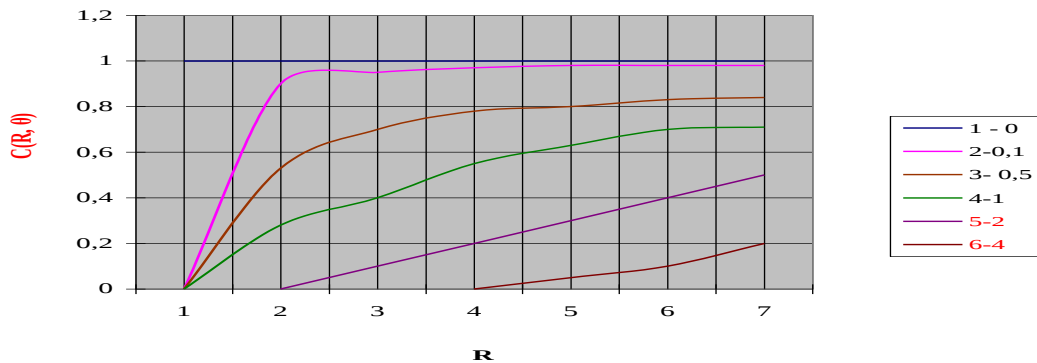


Рисунок 5.16 Нестационарное поле относительных концентраций примесей в ячейке при различных Θ :
 $1 - 0$; $2 - 0,1$; $3 - 0,5$; $4 - 1$; $5 - 2$; $6 - 4$.

Далее проанализируем модель второй стадии (5.32) – (5.34). Для этого рассмотрим квазиэквивалентную ей систему:

$$\partial N(X, \Theta) / \partial \Theta = -\bar{A} \partial N(X, \Theta) / \partial X; \quad (5.54)$$

$$N(X, 0) = 1; \quad (5.55)$$

$$N(0, \Theta) = 0, \quad (5.56)$$

где $\bar{A}$ – эффективная относительная скорость осаждения.

Применим к (5.54) – (5.56) одностороннее преобразование Лапласа по переменной Θ :

$$\partial N_L(X, s) / \partial X + (s/\bar{A}) N_L(X, s) = 1/\bar{A}; \quad (5.57)$$

$$N_L(0, s) = 0, \quad (5.58)$$

где s, N_L – изображения Θ и N .

Общее решение (5.57):

$$N_L(X, s) = \exp(-(s/\bar{A}) X) [C + (1/s) \exp((s/\bar{A}) X)], \quad (5.59)$$

где C – константа интегрирования, которая может быть найдена из (5.58)

$$C = -1/s, \quad (5.60)$$

тогда с учетом (5.60) решение (5.59) запишется

$$N_L(X,s) = 1/s - (1/s) \exp((-s/\bar{A}) X). \quad (5.61)$$

Оригинал (5.61) и будет являться решением задачи (5.54) – (5.56)

$$N(X,\Theta) = I(\Theta) - I(\Theta - X/\bar{A}). \quad (5.62)$$

Для идентификации $\bar{A}$ вновь рассмотрим исходную постановку задачи (5.32) – (5.34), осреднив её по высоте зоны очистки, т. е.

$$\int_0^1 (\partial N(X,\Theta)/\partial \Theta) \partial X = - (A\Theta + 1)^2 \int_0^1 (\partial N(X,\Theta)/\partial X) \partial X,$$

или

$$\partial \bar{N}(\Theta)/\partial \Theta = - (A\Theta + 1)^2 [N(1,\Theta) - N(0,\Theta)],$$

но $N(1,\Theta) = 1$; $N(0,\Theta) = 0$ согласно (6.34), поэтому получим в итоге

$$\partial \bar{N}(\Theta)/\partial \Theta = - (A\Theta + 1)^2; \quad (5.63)$$

$$\bar{N}(0) = 1, \quad (5.64)$$

где $\bar{N}(\Theta) = \int_0^1 N(X,\Theta)/\partial X$.

Решение системы (5.63) и (5.64):

$$\bar{N}(\Theta) = 1 + 1/(3A) - [1/(3A)](A\Theta + 1)^3 \quad (5.65)$$

Безразмерное время полного осаждения Θ^* найдем из условия $N(\Theta^*) = 0$, откуда

$$\Theta^* = (\sqrt[3]{1 + 3A} - 1)/A. \quad (5.66)$$

Возвращаясь к решению (5.56), найдем

$$\bar{N}(\Theta) = \int_0^1 N(X,\Theta)/\partial X = 1 - \bar{A}\Theta,$$

т.е. время осаждения будет $\Theta^* = 1/\bar{A}$, тогда

$$\bar{A} = A / (\sqrt[3]{1 + 3A} - 1). \quad (6.67)$$

Т.о. эквивалентность задач (5.32) – (5.34) и (5.54) - (5.56) доказана.

И, наконец, рассмотрим третью стадию. Вновь применим к системе (5.39) – (5.42) одностороннее преобразование Лапласа по переменной Θ :

$$\partial^2 C_L(X, s) / \partial X^2 - s C_L(X, s) = - 1; \quad (5.68)$$

$$\partial C_L(1, s) / \partial X = 0; \quad (5.69)$$

$$\partial C_L(0, s) / \partial X = K C_L(0, s), \quad (5.70)$$

где s, C_L – изображения Θ, C .

Рассмотрим соответствующее (5.68) однородное уравнение

$$\partial^2 \tilde{C}_L(X,s)/\partial X^2 - s \tilde{C}_L(X,s) = 0,$$

и соответствующее ему характеристическое уравнение

$$\gamma^2 - s = 0,$$

которое имеет решение $\gamma_{1,2} = \pm \sqrt{s}$, тогда общее решение однородного уравнения

$$\tilde{C}_L(X, s) = C_1 sh(\sqrt{s} X) + C_2 ch(\sqrt{s} X),$$

в котором C_1, C_2 – константы интегрирования.

Частное решение (5.68) равно $\tilde{C}_L(X, s) = 1/s$, но тогда общее решение (5.68) есть

$$C_L(X, s) = \tilde{C}_L(X, s) + \tilde{\tilde{C}}_L(X, s) = C_1 s h(\sqrt{s} X) + C_2 c h(\sqrt{s} X) + 1/s. \quad (5.71)$$

Вычислим $\partial C_L(X, s) / \partial X$:

$$\partial C_L(X, s) / \partial X = C_1 \sqrt{s} c h(\sqrt{s} X) + C_2 \sqrt{s} s h(\sqrt{s} X). \quad (5.72)$$

Подставляя (5.71) и (5.72) в (5.69) и (5.70), получим систему линейных уравнений для определения C_1 и C_2 :

$$\begin{cases} C_1 c h \sqrt{s} + C_2 s h \sqrt{s} = 0; \\ C_1 \sqrt{s} = K (C_2 + 1/s), \end{cases}$$

решение которой

$$C_1 = K s h \sqrt{s} / (s(\sqrt{s} s h \sqrt{s} + K c h \sqrt{s})), \quad C_2 = -K c h \sqrt{s} / (s(\sqrt{s} s h \sqrt{s} + K c h \sqrt{s})).$$

Т.о. решение (5.68) – (5.70):

$$C_L(X, s) = 1/s - Kch[\sqrt{s} (1 - X)] / (s(\sqrt{s} sh \sqrt{s} + Kch \sqrt{s})). \quad (5.73)$$

Для нахождения оригинала от (5.73) введем обозначения:

$$\varphi(X, s) = Kch[\sqrt{s}(1 - X)];$$

$$\psi(s) = s(\sqrt{s} sh \sqrt{s} + Kch \sqrt{s}).$$

Найдем корни $\psi(s) = 0$: 1) однократный корень $s = 0$; 2) бесконечное счетное множество корней уравнения

$$\sqrt{s} sh \sqrt{s} + Kch \sqrt{s} = 0, \quad (5.74)$$

но т.к. физическому смыслу отвечают только чисто мнимые s , то $\sqrt{s} = \mu i$, где $i = \sqrt{-1}$, тогда (5.74) преобразуется в уравнение $tg \mu = K/\mu$. (5.75)

Вычислим

$$\psi'(s) = \sqrt{s} sh \sqrt{s} + Kch \sqrt{s} + s(1/(2\sqrt{s}) sh \sqrt{s} + \sqrt{s} ch \sqrt{s} 1/(2\sqrt{s}) + Ksh \sqrt{s} 1/(2\sqrt{s})).$$

Т.к. соблюдены все условия второй теоремы Ващенко-Захарченко, то определим $\varphi(X, 0) = K$; $\psi'(0) = K$; $L^{-1}[1/s] = 1$; $\varphi(X, \mu i) = K \cos[\mu (1 - X)]$; $\Psi(\mu i) = -\mu^2((1/2\mu) \sin \mu + 1/2 \cos \mu + (K/2\mu) \sin \mu)$, откуда
 $C(X, \Theta) = 1 - \varphi(X, 0)/\psi'(0) - \sum_{n=1}^{\infty} (\varphi(X, \mu_n^i) / \psi'(\mu_n^i)) \exp(-\mu_n^2 \Theta)$, т.е.
 $C(X, \Theta) = 2K \sum_{n=1}^{\infty} \cos[\mu_n(1-X)] / (\mu_n[(1+K)\sin\mu_n + \mu_n^2 \cos\mu_n]) \exp(-\mu_n^2 \Theta)$, (5.76)
 где μ_n – корни уравнения (5.75).

Проведем верификацию математической модели. Для этого определим среднюю линейную скорость движения примесей на первой стадии. Учитывая, что принято адгезионное граничное условие на поверхности центра флокуляции, то суммарный конвективный поток примесей к нему логично определить через изменение средней относительной концентрации, которая в сферической системе координат вычисляется из соотношения

$$\bar{C}_T(\Theta) = 3/(\xi^3 - 1) \int_1^{\xi} R^2 C(R, \Theta) dR = 3/(\xi^3 - 1) \int_1^{\xi} (R - \Theta)^2 d(R - \Theta) =$$

$$= 3/(\xi^3 - 1) 1/3 (R - \Theta)^3 \Big|_1^{\xi} = 1/(\xi^3 - 1) [(\xi - \Theta)^3 - (1 - \Theta)^3].$$

Так как $\Theta = 2 \tau u / l_0$ и $\xi = r_2/r_1 = (100 \cdot 10^{-6}) / (10 \cdot 10^{-6}) = 10$, то из условия $\min | \int_0^{\tau^*} [\bar{C}_T(\tau) - \bar{C}_s(\tau)] d\tau |$
 определяем u , которая составила $u = 25 \cdot 10^{-9} \text{ м/с}$ (табл.5.6).

Таблица 5.6 Подтверждение соответствия экспериментальных данных математическим расчетам по первой стадии процесса флокуляции

$\tau, \text{ мин}$	$c_{1K2}/\text{м}^3$	$\bar{C}_T$	$\bar{C}_s$
0	2,700	1	1
1	2,527	0,935	0,936
2	2,119	0,784	0,783
3	1,989	0,737	0,735

Верификацию для второй стадии начнем с аппроксимации изменения характерного линейного размера центра флокуляции по экспериментальным данным (табл. 5.7).

Таблица 5.7 Подтверждение соответствия экспериментальных данных математическим расчетам по второй стадии процесса флокуляции

τ , мин	3	4	5
l , мкм	48	54	60

Используя метод наименьших квадратов получено уравнение

$$l(\tau) = a\tau + l_0,$$

где $a = 10^{-7} \text{ м/с}$; $l_0 = 48 \cdot 10^{-6} \text{ м}$. Для центра флокуляции размером 48 мкм скорость осаждения по Стоксу составит $8,789 \cdot 10^{-4} \text{ м/с}$, тогда безразмерный параметр $A = ah/(l_0 w_0) = (10^{-7} \cdot 0,05)/(4,8 \cdot 10^{-6} \cdot 8,789 \cdot 10^{-4}) = 0,12$ и длительность безразмерного периода осаждения Θ^* составит

$$\Theta^* = (\sqrt[3]{1+3A} - 1)/A = (\sqrt[3]{1+3 \cdot 0,12} - 1)/0,12 \approx 0,9,$$

но так как $\Theta^* = \tau u/h$, то $u = 3,75 \cdot 10^{-4} \text{ м/с}$. Это означает, что на второй стадии происходит существенное увеличение линейной скорости флокуляционного потока за счет конвективного осаждения центров флокуляции, т.е. в этом случае поток примесей захватывается осаждающимся центром флокуляции и практически совпадает со скоростью осаждения.

Исходной информацией по третьей стадии является кинетика изменения концентрации в объеме среды (табл.5.8).

Таблица 5.8 Экспериментальные данные, подтверждающие математическое описание третьей стадии процесса флокуляции

τ , мин	5	10	20	30	40	50	60	90
$\bar{c}$, кг/м ³	1,367	0,629	0,536	0,478	0,367	0,294	0,2	0,2
$\bar{C}$	1	0,46	0,39	0,35	0,27	0,21	0,15	0,15

Воспользуемся понятием квазирегулярного режима, т.е. решение (5.76) можно представить одним членом ряда

$$C(X, \Theta) \approx (2K \cos[\mu_1(1-X)]) \exp(-\mu_1^2 \Theta) / (\mu_1[(1+K)\sin \mu_1 + \mu_1^2 \cos \mu_1]),$$

тогда средняя концентрация примеси равна

$$\bar{C}(\Theta) = \int_0^1 C(X, \Theta) dX = (2K \sin \mu_1) \exp(-\mu_1^2 \Theta) / (\mu_1^2 [(1+K)\sin \mu_1 + \mu_1^2 \cos \mu_1]) \quad (5.77)$$

Разделив числитель и знаменатель на $\sin \mu_1$, и воспользовавшись (5.75), получим

$$\bar{C}(\Theta) = 2K \exp(-\mu_1^2 \Theta) / (\mu_1^2 (1+K + \mu_1^3/K)) \quad (5.78)$$

Очевидно, что при $\Theta = 0$ должно выполняться соотношение

$$2K / (\mu_1^2 (1+K + \mu_1^3/K)) = 1.$$

Так как $0 < \mu_1 < \pi/2$, то взяв $\mu_1 \approx \pi/4$, получим уравнение относительно K :

$$2K / (\pi^2/16(1+K+\pi^3/64K)) = 1, \quad (5.79)$$

Которое имеет решение $K = 0,737$, что означает $K = 1,474 \cdot 10^{-8} \text{ м/с}$.

Согласно разработанной математической модели наибольшая скорость процесса очистки сточных вод *Str. chromogenes s.g. 0832* наблюдается на второй стадии флокуляции, где происходит рост и укрупнение центров флокуляции за счет конвективного потока примесей.

6 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ И ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРОЦЕССА ФЛОКУЛЯЦИИ КЛЕТКАМИ *STR. CHROMOGENES* S.G. 0832

6.1 Сравнительная характеристика эффективности применения актиномицета *Str. chromogenes* s. g. 0832 и других флокулянтов для очистки сточных вод

Несмотря на опыт, накопленный за последние годы в сфере исследования биосорбционного способа очистки сточных вод, осталось много невыясненных вопросов: в каких случаях его использование будет наиболее приемлемым и эффективным, какие условия влияют на протекание данного процесса с наилучшими показателями.

Как показал анализ литературных данных [11,75,80.167,168] в мировой практике очистки сточных вод широкое распространение получили синтетические полимерные флокулянты. В связи с этим представляло определенный интерес сравнить флокулирующую способность предлагаемого микроорганизма и синтетических флокулянтов, используемых в очистке сточных вод.

Из синтетических флокулянтов применяли образцы фирмы Праестол–Маркен (851 BC; 852 BC; 853 BC; 655 BC; 2515 TR). Их характеристика представлена в таблице 6.1.

Таблица 6.1 Флокулянты фирмы Праестол–Маркен

Наименование флокулянта	Характеристика флокулянта	Плотность, кг/м ³	Величина pH
851 BC	Слабо катионный	570-670	7
852 BC	Средне катионный	570-670	7
853 BC	Сильно катионный	570-670	7
655 BC	Очень сильно катионный	570-670	7
2515 TR	Слабо анионный	600-750	7-8

Экспериментально определялось влияние вида флокулянта фирмы Праестол–Маркен на эффект очистки сточных вод. Исследования проводили со сточными водами мясной промышленности. Все образцы вносили в количестве 0,5% к объему стока и через определенные промежутки времени определяли основные характеристики сточной воды. Микроорганизм предварительно выращивали в глубинных условиях 48 часов при температуре 28–30⁰С на среде состава, (г/дм³): картофельный крахмал – 50; соевая мука – 5; измельченное перо – 10; КН₂РO₄ – 0,8; СаСО₃ – 4,0; FeSO₄ – 0,01; ZnSO₄ – 0,02; начальная величина рН культивирования –11,0.

Экспериментальные данные, представленные на рисунке 6.1, показали, что при обработке сточных вод рассматриваемыми флокулянтами, максимальная степень очистки достигается через 30 минут после их внесения в сточную воду. При этом лучшие флокулирующие свойства из образцов фирмы Праестол–Маркен проявил среднекатионный флокулянт 852 ВС. Степень очистки стока по ХПК составила в этом случае 86% от исходного значения, мутность обрабатываемой сточной воды также снизилась на 74% (рис.6.2).

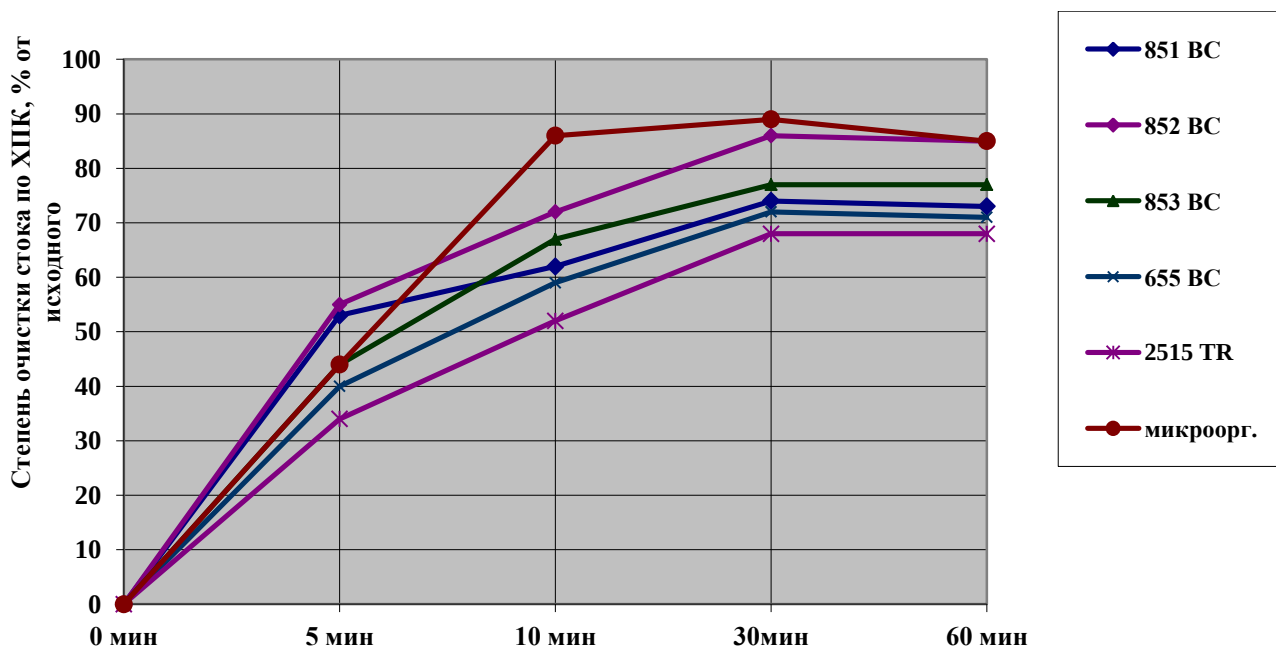


Рисунок 6.1 Сравнительная оценка флокулирующей способности флокулянтов

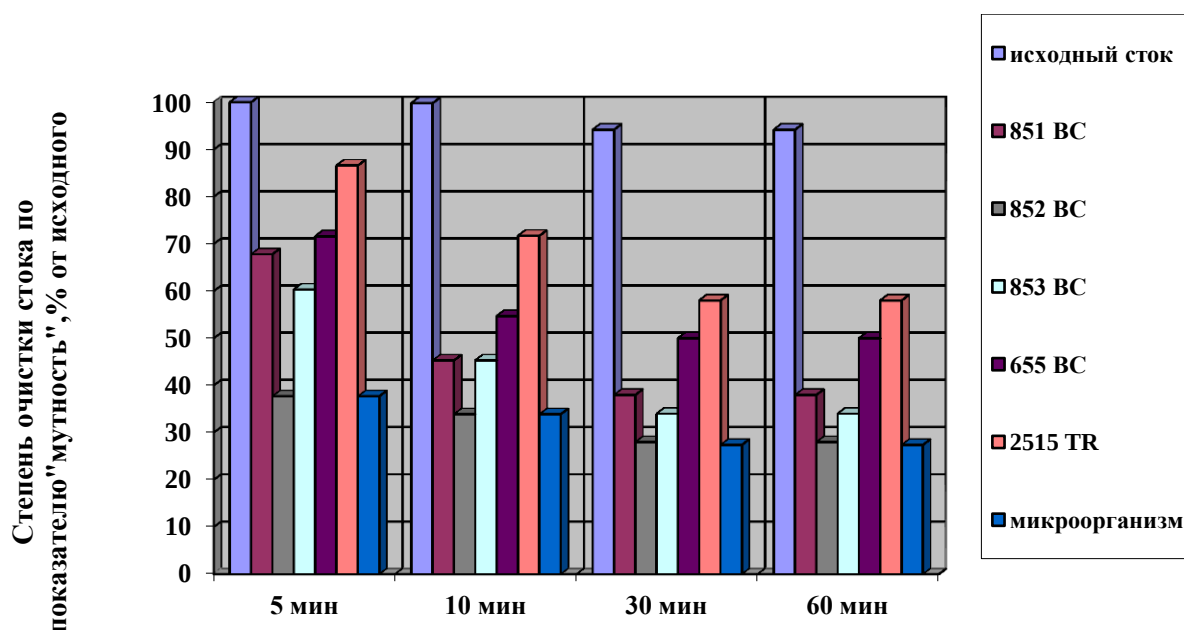


Рисунок 6.2 Изменение мутности стока

Очистка сточных вод *Str. chromogenes s. g.0832* позволила увеличить степень очистки до 87% по ХПК и до 72,6 % по показателю «мутность». Увеличение степени очистки стока происходит за счет снижения ξ -потенциала клеток микроорганизма (табл.6.3), что в свою очередь уменьшает агрегативную устойчивость системы. Проведенные исследования позволяют сделать вывод, что вероятной причиной дестабилизации дисперсий является не только снижение заряда и потенциала частиц, но и образование мостичных связей между частицами через адсорбированные молекулы. Таким образом, *Str. chromogenes s. g. 0832* может успешно конкурировать с синтетическими флокулянтами в очистке сточных вод (табл.6.2). Его применение позволит упростить технологию водоочистки и повысит ее экологическую безопасность.

Таблица 6.2 Наиболее распространенные флокулянты, применяемые в очистке сточных вод

Флокулянт	Происхождение	Заряд	Молекулярная масса	Примечание
Кремневая кислота	Природное	Анионный	1500	Не токсична
Крахмал и его модификации	Природное	Анионный	$1 - 6 \cdot 10^6$	Не токсичен
Альгинат натрия (из морских водорослей)	Природное	Анионный	$15 - 170 \cdot 10^3$	Не токсичен
Флокулянты на основе целлюлозы	Природное	Анионный	40 – 450	Не токсичны
Флокулянты на основе гуаровых смол (из семян бобового растения <i>Cyamopsis psoralea</i>)	Природное	Неионный	$220 \cdot 10^3$	Не токсичны
Хитозан (из хитина ракообразных)	Природное	Катионный	$5 - 15 \cdot 10^4$	Не токсичен, эффективен для сточных вод, содержащих органические коллоиды
Полиэтиленоксид (Полиокс, Алокс Е-65)	Синтетическое	Неионный	$4 \cdot 10^4 - 5 \cdot 10^7$	Токсичен, не зависит от pH раствора, флокулы не прочные
Флокулянты на основе полиакриламида (ПАА-1, ПАА-ГС, Магнофлок, Праестол)	Синтетическое	Катионный, анионный, неионный	$1 - 6 \cdot 10^6$	Токсичны
Полиэтиленимин	Синтетическое	Катионный	$4 - 11 \cdot 10^4$	Токсичен (канцероген)
Биофлокулянты	Природное	Катионный, анионный, неионный	$5 \cdot 10^4 - 8 \cdot 10^6$	Не токсичны,

Таблица 6.3 Изменение ζ -потенциала в процессе очистки стока

Продолжительность очистки стока, мин	0	5	10	15	20	25	30	60
Скорость U при 1В на 1см [$U \cdot 10^{-6}$]	17,3	17,9	19,6	20,0	19,9	22,4	32,0	35,0
ζ -потенциал клеток, мВ	-1,3	-11	-28	-32	-34	-37	-50	-27

Физико-химический состав сточных вод, представленный в таблице 6.4, позволяет сделать вывод о том, что по основным показателям, характеризующим качество очистки сточных вод, *Str. chromogenes s.g 0832* проявил хорошие флокуляционные возможности.

Таблица 6.4 Физико-химический состав сточных вод

Показатели состава сточных вод	Концентрация веществ в стоке, мг/дм ³			
	До очистки	После очистки		По нормативным требованиям
		<i>Str. chromogenes s.g. 0832</i>	852BC	
pH	7,96	6,7	7,0	6-8,5
ХПК, мг O ₂ / дм ³	606,8	78,9	84,9	350,0
Взвешенные вещества, мг/дм ³	54,0	8,9	9,2	15,0
БПК _{полн} , мг/ дм ³	317,4	16,4	18,7	90,0
Хлориды, мг/дм ³	269,7	10,7	12,3	350,0
Сульфаты, мг/дм ³	66,2	8,2	10,3	500,0
Сухой остаток, мг/дм ³	898,4	10,4	12,5	500,0
Азот аммонийный, мг/ дм ³	0,92	0,12	0,15	2,00
Азот нитратов, мг/дм ³	0,52	0,09	0,12	1,00
Азот нитритов, мг/дм ³	0,026	0,003	0,005	1,000
Жиры, мг/ дм ³	20,1	0,9	1,3	20,0

Таким образом, проведенные исследования позволяют судить о том, что актиномицет *Str. chromogenes s.g. 0832* вполне конкурентоспособен современным синтетическим аналогам и может применяться для очистки сточных вод.

6.2 Экспериментальное обоснование выбора условий очистки сточных вод актиномицетом *Str. chromogenes s.g. 0832*

На адсорбцию загрязнений, присутствующих в стоке оказывают влияние: 1) ферментные системы микроорганизма [115]; 2) условия среды [47,50,55]; 3) сорбционные свойства клеток микроорганизма [51,52,54]. Для повышения эффективности осаждения и улучшения качества осветления сточных вод необходимо максимально интенсифицировать процесс биофлокуляции. Этого можно достичь получением как можно большего числа флокул (центров коагуляции), а также выделением клетками актиномицета внеклеточных биополимеров. Оба эти эффекта достигаются воздействием на клетки микроорганизма различными физико-механическими методами, например ультразвуком. Значительная роль в процессе биофлокуляции принадлежит, по нашему мнению, непосредственно ферментным системам актиномицета. Для подтверждения этого были проведены исследования по влиянию ультразвука на ферментативную активность рассматриваемого микроорганизма. Известно, что ультразвук способен повышать активность ферментных систем микроорганизмов [157,161]. При его использовании возможно частичное разрушение белков стока. Это делает их более доступными ферментативному гидролизу. Кроме того, ультразвуковая обработка стока увеличивает содержание аминокислот в нем. А это в свою очередь стимулирует активность щелочных протеаз [13]. Следует отметить, что протеолитический комплекс ферментов *Str. chromogenes s. g. 0832* представлен именно щелочными протеазами [19]. Эксперимент

проводился в стационарных условиях на ультразвуковой установке УЗДН – 2Т частотой 22 кГц при интенсивности ультразвукового воздействия 4; 6; 8 Вт/см² и продолжительности воздействия 0,5; 1,5 и 2,5 мин. Результаты эксперимента представлены в таблице 6.5.

Таблица 6.5 Влияние низкочастотного ультразвука на ферментативную активность *Str. chromogenes s. g. 0832*

Показатели	Эффективность, %			
	Исх. сток	0,5 мин	1,5 мин	2,5 мин
	I = 4 Вт/см ²			
ПА	100	115,2	126,5	135,6
КА	100	130,1	146,8	152,5
I = 6 Вт/см ²				
ПА	100	110,0	124,8	130,1
КА	100	128,1	137,3	150,7
I = 8 Вт/см ²				
ПА	100	106,0	117,3	111,2
КА	100	132,3	136,2	131,2

В целом при обработке ультразвуком протеолитическая и кератиназная активности *Str. chromogenes s. g. 0832* возрастают при всех интенсивностях ультразвука. При этом уровень кератиназной активности выше протеолитической в среднем на 20%. Однако, интенсивность и продолжительность ультразвукового воздействия оказывают неоднозначное влияние на рост протеолитической и кератиназной активности. При обработке стока с интенсивностью 4 Вт/см² для всех интервалов времени воздействия характерно увеличение протеолитической и кератиназной активности. Такая же зависимость сохраняется и при интенсивности 6 Вт/см², но величина протеолитической и кератиназной активности несколько ниже. При

интенсивности обработки 8 Вт/см^2 в интервале времени 0,5 – 1,5 мин происходит увеличение протеолитической и кератиназной активности, которые затем снижаются при продолжительности 2,5 мин. Это связано с тем, что при более мягких режимах происходит не только разрушение белков стока, индуцирующих синтез протеаз [245,258,261], но и активизация ферментных систем микроорганизма под действием ультразвука. Жесткий режим, скорее всего, ингибирует активность ферментов, разрушает их. Это подтверждают и данные таблицы 6.6. По представленным результатам можно судить о том, что содержание белка и аминокислот в стоке при обработке ультразвуком различной интенсивности в течение всего интервала времени возрастало. При этом количество белка и аминокислот в стоке зависело от режима ультразвукового воздействия и было максимальным при интенсивности 8 Вт/см^2 и продолжительности 2,5 мин, хотя ферментативная активность для этого режима обработки была невысокой (табл. 6.6).

Таблица 6.6 Влияние низкочастотного ультразвука на содержание белка и свободных аминокислот в стоке

Показатели	Содержание в % к исходному стоку			
	Исходный сток	0,5 мин	1,5 мин	2,5 мин
$I = 4 \text{ Вт/см}^2$				
Белок	100	118,40	118,65	120,30
Аминокислоты	100	156,25	161,32	161,30
$I = 6 \text{ Вт/см}^2$				
Белок	100	104,30	106,05	115,08
Аминокислоты	100	158,00	162,70	166,00
$I = 8 \text{ Вт/см}^2$				
Белок	100	110,30	129,70	137,30
Аминокислоты	100	163,00	165,65	169,85

Полученные экспериментальные данные позволяют судить о том, что ультразвуковая обработка стока способствует интенсивному высвобождению внеклеточных ферментов *Str. chromogenes s. g. 0832*, а также увеличению растворимого белка в стоке, что активизирует ферментные системы микроорганизма и способствует более интенсивному гидролизу этих белков.

Проведенные исследования позволяют сделать вывод о том, что на первом этапе очистка сточных вод в большей степени протекает за счет электростатических сил, а уже затем за счет образования мостиков между дисперсными частицами через клетки актиномицета.

Это подтверждают также данные, представленные на рисунке 6.3. Обработку сточных вод проводили:

- 1) культуральной жидкостью *Str. chromogenes s. g. 0832*, содержащей ферменты (протеазу и кератиназу) и живые клетки микроорганизма (КЖ);
- 2) фильтратом, содержащим ферменты (протеиназу и кератиназу)(Ф);
- 3) биомассой микроорганизма *Str. chromogenes s. g. 0832* (Б).

По экспериментальным данным (рис. 6.3) можно сделать вывод, что лучше всего процесс очистки проходил при внесении в сточную воду живой культуры микроорганизма, т.е. ферменты, выделяемые актиномицетом в окружающую среду (сточную воду) играют ведущую роль на первом этапе очистки, а затем в очистку включается и сама биомасса. Разрушенная биомасса по эффективности очистки в данном эксперименте занимает второе место. Клетки микроорганизма не дают дополнительного количества ферментов для очистки стока, но за счет накопившихся ферментов и самого мицелия эффективность очистки выше, чем при очистке стока фильтратом культуральной жидкости, содержащей только ферменты, успевшие выделиться на этапе биосинтеза *Str. chromogenes s. g. 0832*.

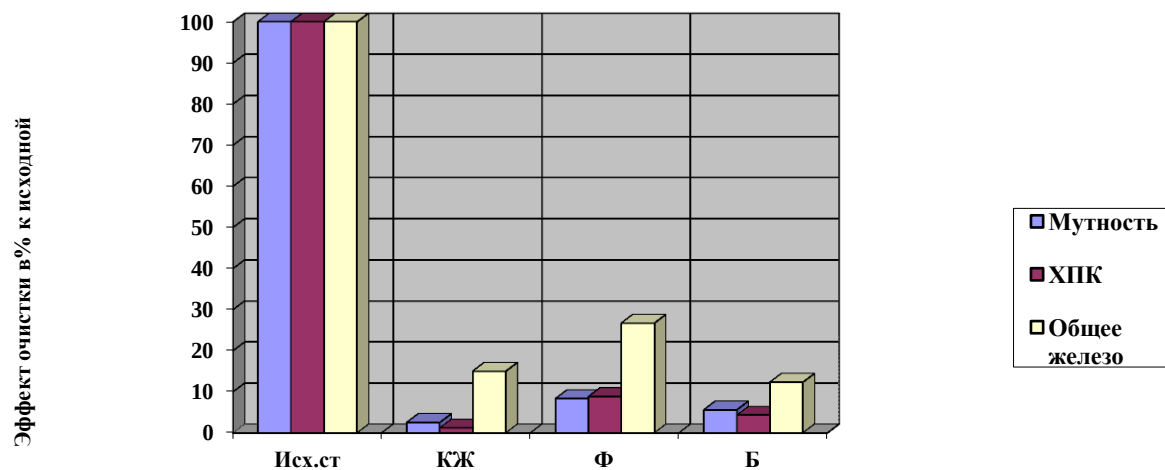
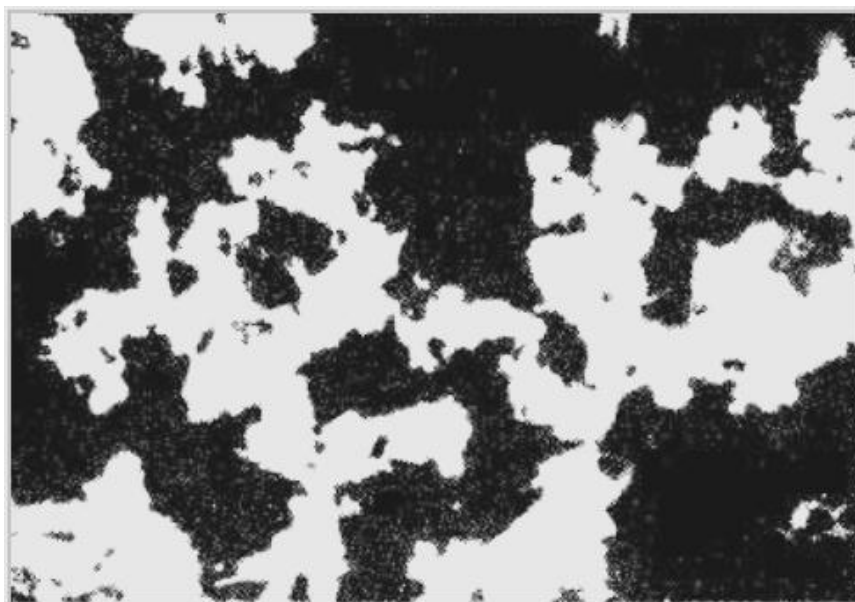


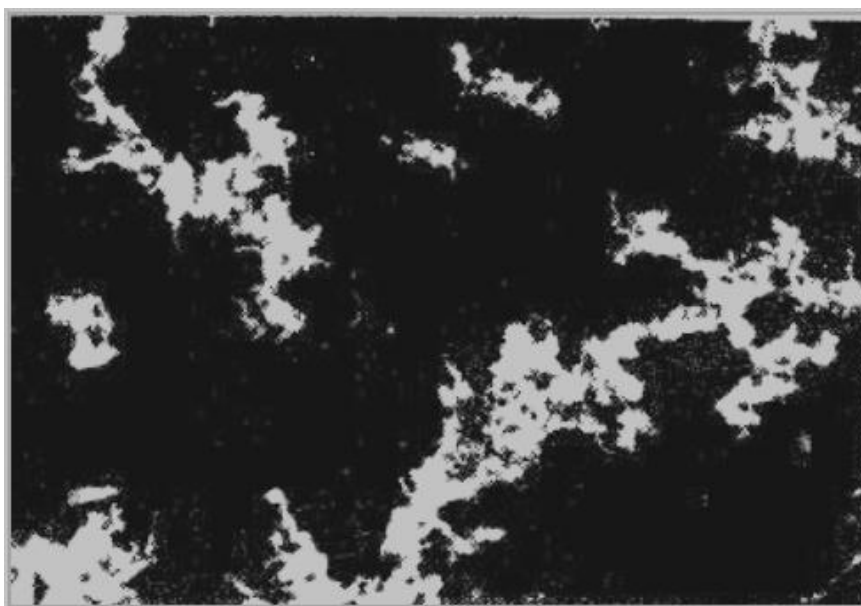
Рисунок 6.3 Влияние условий проведения флокуляции на эффективность очистки сточных вод

Бактериальные клетки актиномицета, разрушенные с помощью ультразвука, представлены на рисунке 6.4.

Размер образовавшихся флокул, определенных методом светорассеяния, составляет в среднем 50 – 600 мкм.



а



б

Рисунок 6.4 Изменение структуры флоккул через 1 ч (а) и 9 ч (б)
(увеличение 15 * 90) [184]

На качество очистки стоков от загрязнений сильное влияние оказывает величина рН. При определенном значении рН клетки микроорганизмов адсорбируют наибольшее количество загрязнений. При рН, отличающихся от этого значения, адсорбция ухудшается и при некоторых значениях рН может совсем прекратиться. По литературным данным известно, что в щелочной области наступает усиление адсорбционного взаимодействия

некоторых микроорганизмов [196,218,233.237.255]. Механизм влияния pH на адсорбционное взаимодействие в системе сточная вода - микроорганизм рассматривали многие исследователи [10,58,59]. В этом взаимодействии большая роль отводится электростатическим силам, и при достижении pH среды, равном или близком изоэлектрическому состоянию клеток микроорганизмов, действие электрического фактора снижается и происходит усиление адсорбционного взаимодействия между минеральными частицами и клетками микроорганизма [41,184,187,194].

Для удовлетворительной работы активного ила необходима нейтральная реакция среды 6,5–8,0. Понижение величины pH сточной воды приводит к снижению интенсивности обмена у бактерий, дефлокуляции и плохой осаждаемости активного ила, а при падении pH ниже 5,0 бактерии антагонистически вытесняются грибами. Это позволяет судить о том, что в данных условиях популяции грибов будут доминировать над бактериями и определять эффективность очистки сточных вод. Увеличение pH повышает интенсивности обмена активного ила, а при сильнощелочной среде (pH более 8,5) большинство клеток активного ила гибнет.

Но при очистке сточных вод клетками *Str. chromogenes s.g. 0832* наилучший эффект осветления наблюдался в интервале pH =8,0–11,0. В этом диапазоне степень осветления увеличивалась до 46,2% [41,184]. В щелочной среде белковые молекулы заряжены значительно слабее, чем в кислой, вследствие чего, в щелочной среде адсорбционное осаждение белка проявляется в большей степени [173]. Это также связано с оптимальными значениями pH ферментов актиномицета (п. 4.2, 4.3), при которых *Str. chromogenes s.g. 0832* доминирует над другими популяциями, находящимися в сточной воде.

Известно, что все жизненные функции микроорганизмов определяются и направляются их ферментативным аппаратом. Ранее (гл.3) были изучены условия роста *Str. chromogenes s.g. 0832* и свойства его ферментных систем

(гл.4). С учетом этих особенностей была определена эффективность очистки сточных вод в зависимости от возраста актиномицета. Нами установлено, что с увеличением возраста культуры флокулирующая способность микроорганизма уменьшается [41,184]. Наилучший эффект очистки стока наблюдается при внесении 48-часовой культуры микроорганизма. Возможно, это связано также с повышенным уровнем активности ферментов рассматриваемого микроорганизма, так как, протеолитическая и кератиназная активности к этому времени также достигали своего максимума (табл.6.7). Затем мутность стока повышалась, что связано с лизисом клеток и, как следствие, уменьшением биомассы. Это позволяет утверждать, что эффективность очистки достигается за счет совместных процессов: флокуляции и гидролиза белков стока ферментными системами микроорганизма [41,55].

Таблица 6.7 Влияние возраста культуры *Str. chromogenes* s.g 0832 на эффективность очистки сточных вод

Показатели	Возраст <i>Str. chromogenes</i> s.g 0832, вносимого в сточную воду				
	Исходный сток	24 часа	48 часов	72 часа	96 часов
ХПК, мгО ₂ /дм ³	2700	522	215	325	394
Мутность, мг/дм ³	5,31	1,88	0,92	1,26	1,33
ПА, ед/дм ³	0	0,8	6,0	4,6	3,9
КА, ед/дм ³	0	1,2	32,0	32,0	29,3
Биомасса, г/дм ³	0	1,17	1,5	1,3	1,1

Кроме того, на качество очистки сточных вод могут влиять характер клеточной поверхности, компоненты культуральной жидкости, а также вещества, выделяющиеся в процессе жизнедеятельности микроорганизмов, что приводит к дополнительному расходу флокулянта. В связи с этим необходимо было установить оптимальное соотношение объема сточной воды и вносимой

культуральной жидкости. Определение оптимальной дозы реагентов представляет собой достаточно сложную задачу, так как в практике очистки воды возможно одновременное изменение ряда факторов, в том числе состава и количества примесей. Нахождение зависимостей, связывающих расход реагентов с концентрацией примесей, как правило, связано с использованием теории Ла Мера. Зависимость полной оптимальной дозы коагулянта от концентрации примесей (C) описывается U – образной кривой. При $C < C_{кр}$ ход коагуляции (флокуляции) определяется в основном кинетикой процесса коагуляции (флокуляции), при $C > C_{кр}$ – главным образом дестабилизацией примесей продуктами гидролиза коагулянта (флокулянта). При $C = C_{кр}$ расход коагулянта (флокулянта) минимальный [28,41,184,196]. В нашем случае значительное осветление стока происходило при внесении 2,5 – 3 % культуральной жидкости актиномицета к объему стока.

Снижение скорости флокуляции при малых дозах флокулянта может быть объяснено быстрым достижением равновесной толщины адсорбционного слоя. В этом случае биофлокуляция определяется захватом, фиксацией приближающейся непокрытой частицы периферической частью адсорбированных петель, средняя длина которых мало зависит при данной величине адсорбции от общей массы (M). Существенная зависимость эффективности флокуляции от величины M при единовременном добавлении биофлокулянта обусловлена, вероятно, тем, что время установления адсорбционного равновесия между высокомолекулярным флокулянтom и частицами стока значительно больше, чем промежуток между столкновениями частиц в ходе броуновского движения [41,51,184].

Температура, при которой осуществляется процесс очистки стока, также является важным показателем. Температурный режим может повысить или понизить эффективность очистки [57]. Очистку стока проводили при температурах +10°C, +20°C, +30°C, +40°C, +50°C. Эффективность очистки определяли по ХПК, которая на момент проведения эксперимента составила 1423,7 мгО₂/дм³.

Проведенные ранее исследования показали, что наилучший эффект очистки наблюдается при температуре 20–30°C [41,184]. Следует обратить внимание на то, что и при более высоких температурах степень очистки стока достаточно высока. Это лишний раз подтверждает, что выбранный микроорганизм проявляет себя не только как флокулянт, но и использует специфичный ферментативный комплекс, оптимум действия которого находится в этом температурном режиме.

Так как, актиномицет *Str. chromogenes s.g. 0832* относится к аэробам, то на эффективность очистки сточных вод влияет концентрация кислорода, поддерживающая метаболические процессы в клетках микроорганизма. Перемешивание сточных вод с биофлокулянтom проводили барботированием воздухом. Такой способ аэрации (барботирование) позволяет равномерно перемешивать сточные воды с культуральной жидкостью микроорганизма и формировать хлопья с достаточно плотной упаковкой. Максимальный эффект флокуляции наблюдается при концентрации кислорода 1,4 мг/дм³ [41,184].

Подбор оптимальных условий очистки сточных вод проводился методом планирования эксперимента [53]. На эффект очистки одновременно влияет несколько факторов, поэтому задача решалась в несколько этапов.

За базовые были взяты следующие параметры условий очистки стока: возраст микроорганизма – 48 ч; количество вносимой культуральной жидкости микроорганизма к объему стока – 3%; pH – 9; температура, при которой, происходит очистка – 20°C; концентрация кислорода – 1,4 мг/дм³, продолжительность процесса биосорбции τ – 30 мин.

На первом этапе изучено влияние следующих условий:

X_1 – возраст вносимой в сточную воду культуры микроорганизма;

X_2 – величина pH;

X_3 – соотношение культуры микроорганизма и стока .

Пределы изменения факторов приведены в таблице 6.8. Остальные факторы оставались на базовом уровне.

Таблица 6.8 Пределы изменения факторов

Факторы	X_1 , ч	X_2	X_3
Основной уровень	48	9	2,5
Интервал	24	1	0,5
Верхний уровень	72	10	2,0
Нижний уровень	24	8	3,0

Матрица планирования эксперимента и результаты представлены в таблице 6.9.

Таблица 6.9 Матрица планирования и результаты эксперимента

№ опыта, N	X_1	X_2	X_3	$Y_{\text{ср}}$, степень очистки стока, %	Обозначение строк в матрице
1	24	8	35	47	X_0
2	72	8	35	53	X_1
3	24	10	35	65	X_2
4	72	10	35	84	X_3
5	24	8	45	53	X_1X_2
6	72	8	45	73	X_1X_3
7	24	10	45	65	X_2X_3
8	72	10	45	92	$X_1X_2X_3$

Для исследования был выбран полный факторный эксперимент 2^3 . Опыты в каждой точке матрицы дублировались трижды, т. е. $m = 3$. Воспроизводимость опытов проверялась по критерию Кохрена

$$G = S_{\max}^2 / S_{\Sigma}^2 = 19/59 = 0,322, \quad (6.1)$$

где $S_{\max}^2$ – максимальная построчная дисперсия.

Табличное значение критерия Кохрена при $N = 4$, $m = 3$, $p = 0,95$ составляет $G_T = 0,768$. Следовательно, процесс воспроизводим и при планировании можно предсказать ожидаемые результаты эксперимента.

Полученное уравнение регрессии имеет вид:

$$Y = 66,5 + 9X_1 + 10X_2 + 4,25X_3 + 2,5X_1X_2 + 2,75X_1X_3 - 2,25X_2X_3. \quad (6.2)$$

Адекватность результатов эксперимента проверялась по критерию Фишера

$$F = S_{\text{ад}}^2 / S_{y \text{ ср}}^2, \quad (6.3)$$

где $S_{y \text{ ср}}^2$ – усредненная дисперсия эксперимента. В данном случае

$$S_{y \text{ ср}}^2 = 2,45;$$

$S_{\text{ад}}^2$ – дисперсия адекватности (остаточная дисперсия);

$$S_{\text{ад}}^2 = \sum (Y_{\text{pi}} - Y_{\text{срi}})^2 / (N - k - 1),$$

где Y_{pi} – рассчитанные по полученному уравнению значения выхода при значениях кодированных переменных, соответствующих каждой из строк матрицы планирования; $Y_{\text{срi}}$ – усредненное значение выхода, полученное при реализации повторных опытов для соответствующей строки; N – число вариантов в матрице планирования; k – число варьируемых факторов. В данном случае $S_{\text{ад}}^2 = 4,48 / 4 = 1,12$. Тогда расчетное значение критерия Фишера $F_p = 1,12 / 2,45 = 0,46$. $F_T = 3,01$ при $f_1 = N - k - 1 = 8 - 3 - 1 = 4$; $f_2 = N \cdot (m - 1) = 8 \cdot (3 - 1) = 16$; уровне значимости $q = 0,05$. Поэтому гипотеза об адекватности данных математических представлений результатов эксперимента может быть принята [53].

На втором этапе варьировались:

X_1 – температура, при которой происходила очистка сточных вод;

X_2 – интенсивность аэрации;

X_3 – продолжительность процесса очистки стока.

Величины других факторов, влияющих на очистку стока, оставались на базовом уровне. Пределы изменения исследуемых факторов представлены в таблице 6.10.

Таблица 6.10 Пределы изменения температуры , концентрации кислорода, продолжительности процесса очистки

Факторы	$X_1, ^\circ\text{C}$	$X_2, \text{мг/дм}^3$	$X_3, \text{мг/дм}^3$
Основной уровень	20	1,4	30
Интервал варьирования	10	0,2	20
Верхний уровень	30	1,6	50
Нижний уровень	10	1.2	10

Матрица планирования 2^3 и результаты эксперимента представлены в таблице 6.11.

Таблица 6.11 Матрица планирования и результаты эксперимента

№ опыта, N	$X_1, ^\circ\text{C}$	$X_2, \text{мг/дм}^3$	$X_3, \text{мг/дм}^3$	$Y_{\text{ср}}, \text{степень очистки стока, \%}$	Обозначение строк в матрице
1	10	1.2	10	48,3	X_0
2	30	1.2	10	83,7	X_1
3	10	1.6	10	62,7	X_2
4	30	1.6	10	88,0	X_3
5	10	1.2	50	78,0	$X_1 X_2$
6	30	1.2	50	88,0	$X_1 X_3$
7	10	1.6	50	91,0	$X_2 X_3$
8	30	1.6	50	93,0	$X_1 X_2 X_3$

Воспроизводимость опытов проверялась по критерию Кохрена (6.1)

$$G = 36 / 98 = 0,367.$$

Табличное значение критерия Кохрена при $N = 8$, $m = 3$, $p = 0,95$ составляет $G_T = 0,768$. Следовательно, процесс воспроизводим и при планировании можно предсказать ожидаемые результаты эксперимента.

Полученное уравнение регрессии имеет вид:

$$Y = 79,1 + 9,1X_1 + 4,6X_2 + 8,4X_3 - 2,3X_1X_2 - 6,1X_1X_3 \quad (6.4)$$

Адекватность результатов эксперимента проверялась по критерию Фишера. Расчетное значение критерия Фишера $F_p = 0,1575 / 4,08 = 0,039$.

$F_T = 3,01$ при $f_1 = N - k - 1 = 8 - 3 - 1 = 4$; $f_2 = N \cdot (m - 1) = 8 \cdot (3 - 1) = 16$; уровне значимости $q = 0,05$. Поэтому гипотеза об адекватности данных математических представлений результатов эксперимента может быть принята.

Таким образом, после полного факторного эксперимента [53] были определены условия, при которых рекомендуется проводить очистку сточных вод мясоперерабатывающих производств:

- возраст культуры клеток *Str. chromogenes* s.g. 0832: 48 – 72 часа;
- температура: 25 – 30°C;
- величина pH: 7,0 – 10,0;
- количество вносимой культуральной жидкости микроорганизма к объему стока: 2%;
- концентрация кислорода: 1,6 – 1,8 мг/дм³;
- продолжительность биосорбции: 30 – 50 мин.

При проведении очистки сточных вод в этих условиях удалось снизить ХПК на 88%, БПК – на 95%, при этом уменьшается содержание хлоридов, сульфатов и других компонентов (табл. 6.12).

Таблица 6.12 Физико-химический состав сточных вод до и после очистки

Показатели состава сточных вод	Концентрация веществ в стоке, мг/дм ³			
	До биологическо й очистки	После биологической очистки предприятия	После очистки <i>Str.</i> <i>chromogenes</i> <i>s.g 0832</i>	По нормативным требованиям
рН	7,96	7,36	6,76	6-8,5
ХПК, мгО ₂ /дм ³	649,2	7,6	73,8	350
Взвеш.вещест. мг/ дм ³	188,9	6,88	8,9	15
БПК _{полн} , мг/дм ³	260,0	27,0	16,4	90
Хлориды, мг/ дм ³	761,6	415,9	10,7	350
Сульфаты, мг/ дм ³	116,0	82,5	8,2	500
Сухой остаток, мг/дм ³	1518,5	870,0	10,4	500
Азот аммонийный, мг/ дм ³	30,8	1,85	0,12	2,0
Азот нитратов, мг/дм ³	14,45	23,75	0,09	1,0
Азот нитритов, мг/дм ³	0,12	0,13	0,003	1,0
Жиры, мг/ дм ³	9,0	0,7	0,09	20

По лабораторным исследованиям были проведены полупроизводственные испытания на МПК «Ясные зори» филиала ООО «Белгранкорм» (Приложение А). Данные испытания подтвердили, что предлагаемый способ очистки вполне реализуем в производственных условиях.

Ранее было установлено, что обработка культуральной жидкости ультразвуком способствует повышению ферментативной активности *Str. chromogenes s.g. 0832*, а также культивирование его совместно с ПАА и

$\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ повышает эффект очистки на 20 – 50 %, поэтому была проведена очистка сточных вод в оптимальных режимах, с учетом указанных особенностей. Результаты эксперимента представлены в таблице 6.13.

Исследование процесса биосорбции культурой *Str. chromogenes s.g. 0832* позволило разработать технологические схемы очистки сточных вод мясоперерабатывающих производств (рис. 6.5, 6.6, 6.7, 6.8). По результатам этих исследований также были проведены полупроизводственные испытания на ООО «Петровский мясокомбинат» (Приложение Б, В).

Таблица 6.13 Физико-химический состав стока после очистки

Показатели	Очистка стока культурой микроорганизма <i>Str. chromogenes s.g. 0832</i> , выращенного в оптимальных условиях		
	С добавлением ПАА, 0,003%	С добавлением $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, 0,003%	Обработанного ультразвуком $I = 4\text{Вт/м}^2$, $\tau = 2,5$ мин
ХПК, $\text{мгO}_2/\text{дм}^3$	47,9	59,0	44,3
Взвешенные вещества, мг/дм^3	5,8	7,1	5,3
БПК, $\text{мгO}_2/\text{дм}^3$	10,7	13,1	9,8
Хлориды, мг/дм^3	7,0	8,6	6,4
Сульфаты, мг/дм^3	5,3	6,6	4,9
Сухой остаток, мг/дм^3	6,8	8,3	6,2
Азот аммонийный, мг/дм^3	0,08	0,1	0,07
Азот нитратов, мг/дм^3	0,06	0,07	0,06
Азот нитритов, мг/дм^3	0,002	0,0024	0,0018
Жиры, мг/дм^3	0,06	0,07	0,06

Необходимо отметить, что количественный состав исходных загрязненных вод не сбалансирован по составу для культуры *Str. chromogenes s.g. 0832*, и назвать условия, в которые попадают клетки микроорганизма, оптимальными нельзя.

Но так как процесс контакта микроорганизма с загрязненной водой не превышает 30 – 60 минут, то можно пренебречь отсутствием оптимальных условий, а внесение культуральной жидкости, полученной в сбалансированных условиях, является главным фактором в данном методе очистки.

Поэтому, биофлокулянт *Str. chromogenes s.g. 0832* может успешно конкурировать с традиционными флокулянтами в водоподготовке и очистке сточных вод. Его применение позволит внедрить технологию оборотного водоснабжения, что повысит экологическую безопасность производства.

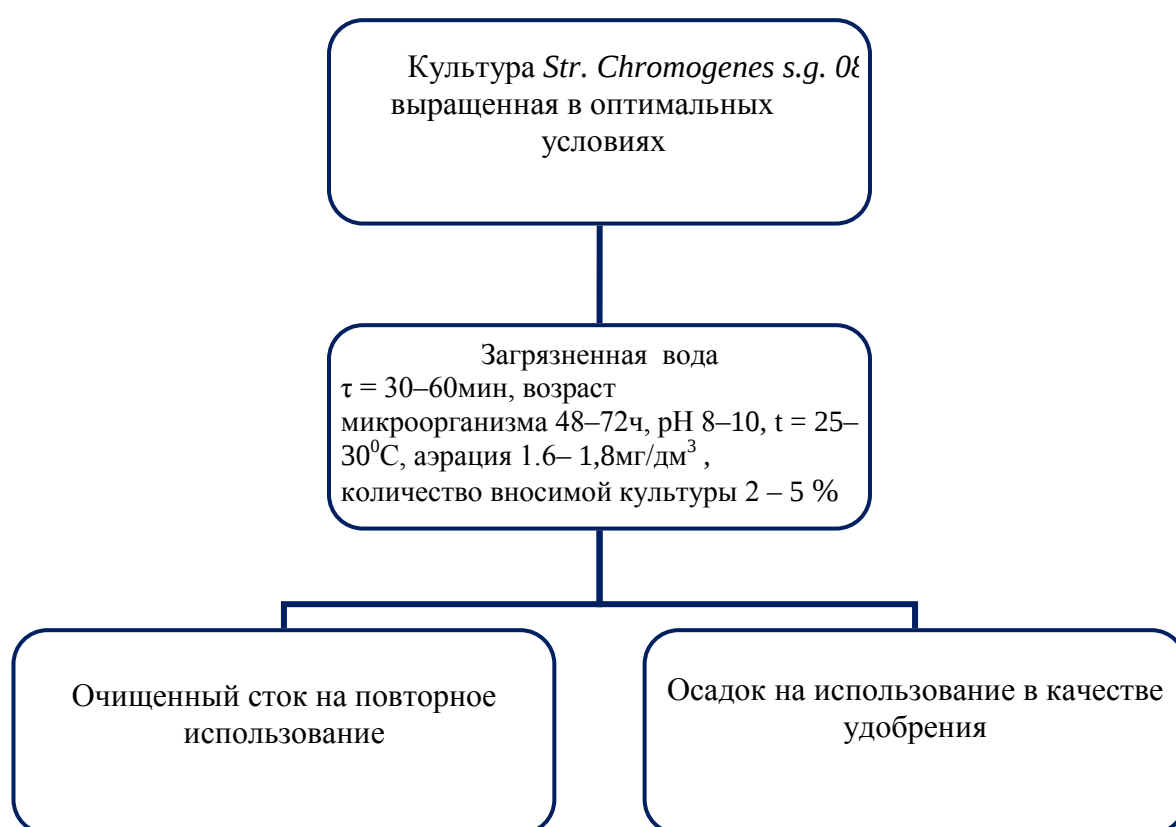


Рисунок 6.5 Схема очистки загрязненных вод
мясоперерабатывающих предприятий биофлокулянтom
Str. chromogenes s.g 0832

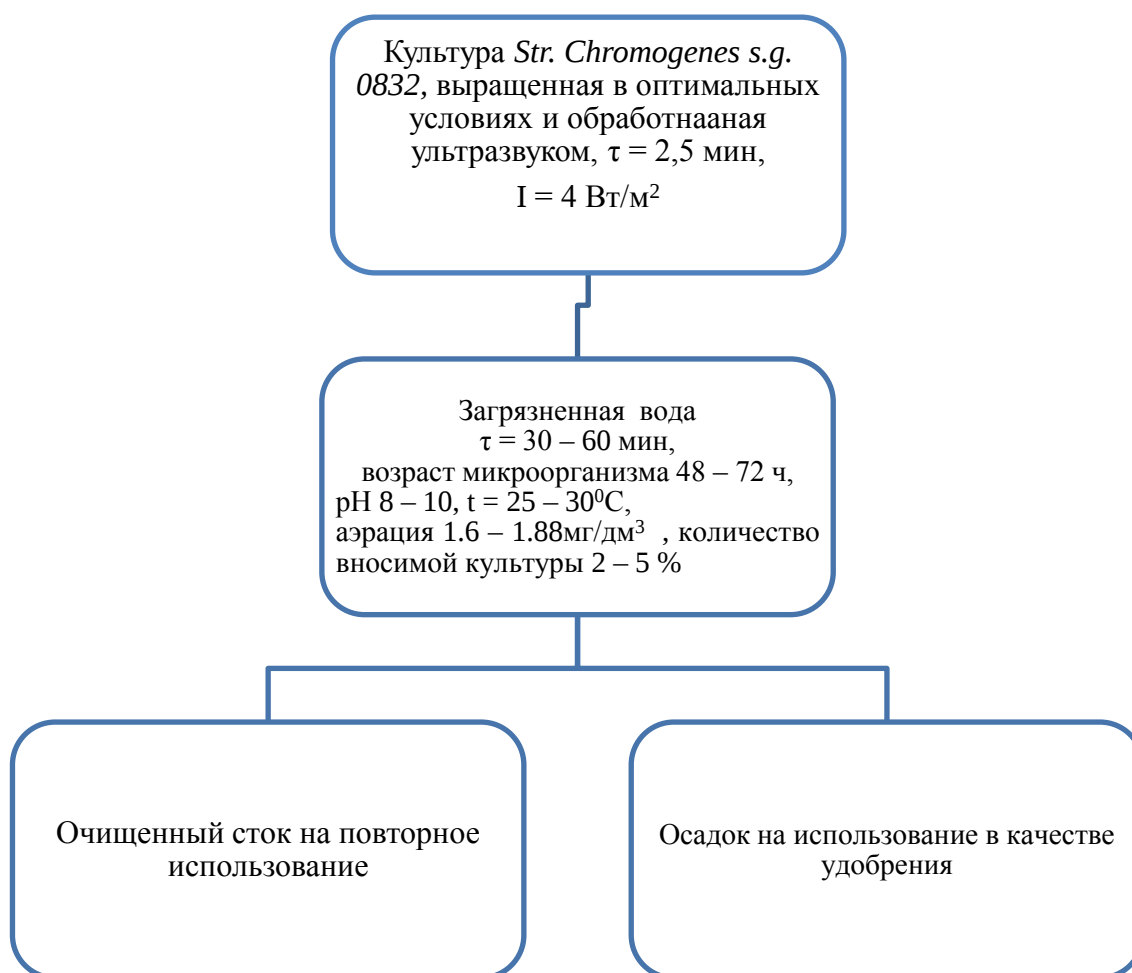


Рисунок 6.6 – Схема очистки загрязненных вод мясоперерабатывающих предприятий биофлокулянтном *Str. chromogenes s.g 0832*, предварительно обработанного ультразвуком

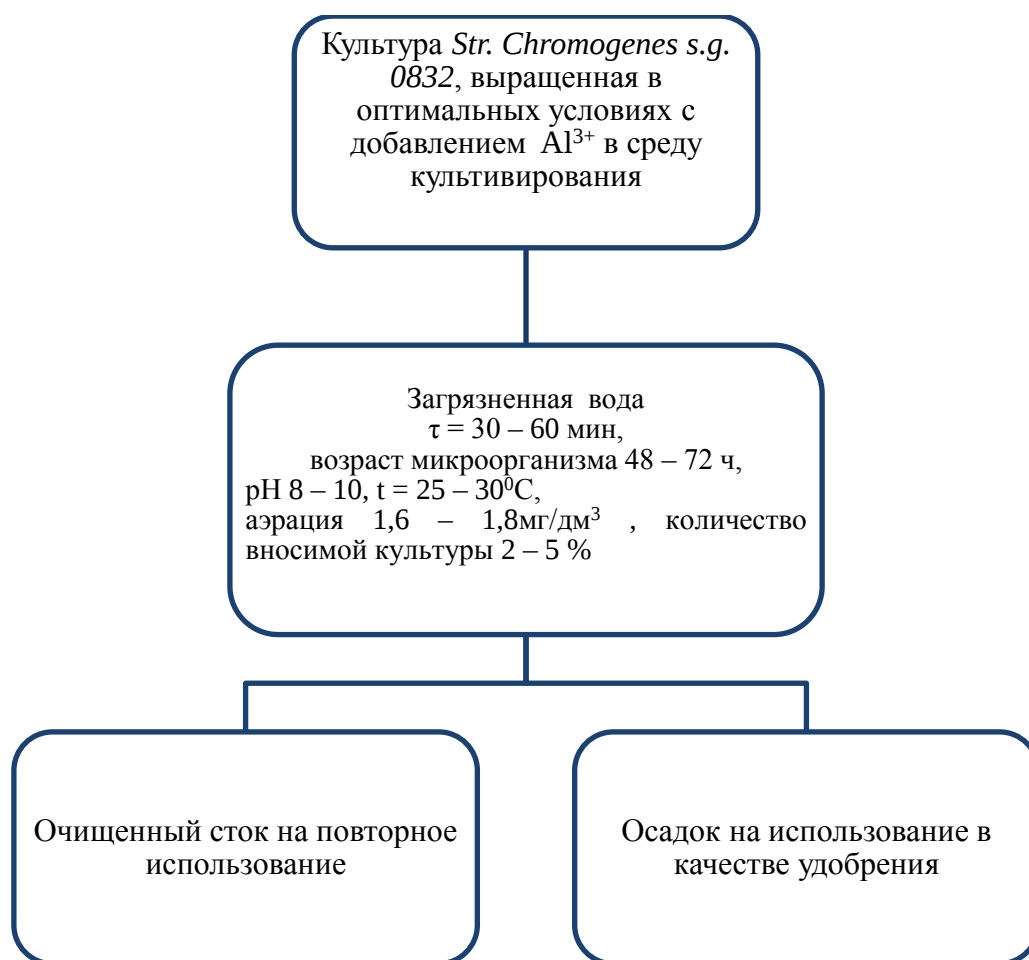


Рисунок 6.7 Схема очистки загрязненных вод мясоперерабатывающих предприятий биофлокулянтном *Str. chromogenes s.g 0832*, выращенного на среде с Al^{3+}

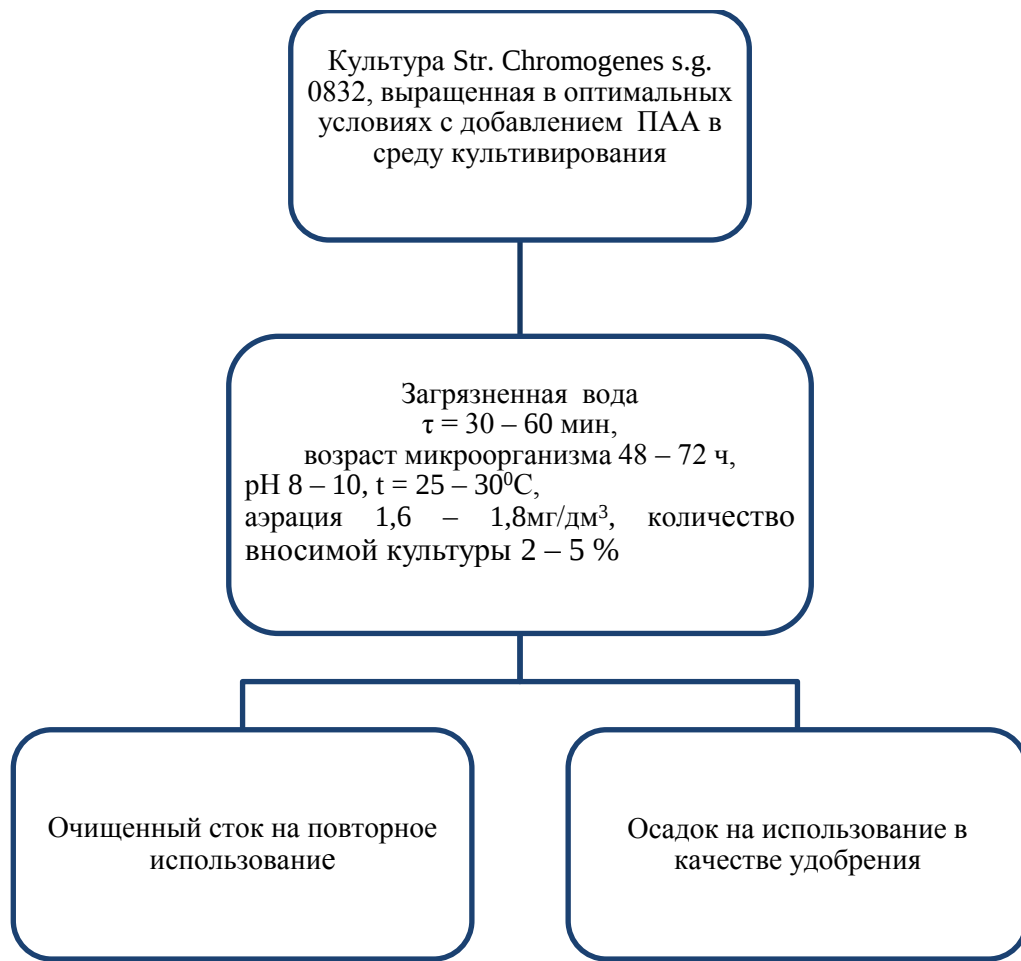


Рисунок 6.8 Схема очистки загрязненных вод мясоперерабатывающих предприятий биофлокулянтom *Str. chromogenes s.g* 0832, выращенного на среде с ПАА

7 УТИЛИЗАЦИЯ ОСАДКОВ СТОЧНЫХ ВОД

7.1 Характеристика осадка сточных вод, полученного в результате обработки стоков *Str. chromogenes* s.g. 0832

Образующиеся после очистки сточных вод осадки представляют на сегодняшний день серьёзную проблему. Существует реальная угроза ухудшения экологической обстановки. По оценке Пахненко Е.П. [182] ежегодные объёмы производства осадков сточных вод в России достигают 3,4 млн.т., до 60 % в них приходится на органическую составляющую. Однако применение ОСВ в нашей стране в качестве биоудобрений очень ограничено. Большая часть осадков сточных вод вывозится на полигоны твердых бытовых отходов без предварительного обезвреживания. При этом безвозвратно теряются ценные органические вещества.

В то же время многочисленные исследования ученых в нашей стране и за рубежом показали положительное влияние осадков сточных вод на процесс почвообразования, улучшение биологических и других свойств почв [3,7,97].

Почвенный способ обезвреживания осадков сточных вод является наиболее эффективным. Кроме того, он позволяет включить в малый биологический круговорот большое количество питательных веществ и органического вещества, что приводит к значительному повышению плодородия почв и продуктивности сельскохозяйственных культур.

Проведенный анализ позволяет судить о том, что по химическому составу осадки сточных вод (ОСВ) нестабильны, но основным компонентом в них является белок (37–52% в иле в пересчете на сухое вещество) (табл.7.1). По сравнению с минеральными удобрениями они одновременно содержат все необходимые питательные вещества и хорошо усваиваются почвами.

Таблица 7.1 Физико-химический состав осадка сточных вод

Наименование показателя	ОСВ <i>Str. chromogenes s.g.</i> 0832	Требования к ОСВ, используемым в качестве удобрений
Массовая доля органических веществ, % в пересчете на сухое веществ, не менее	57,3	20 (ГОСТ 26213)
Массовая доля общего азота, % в пересчете на сухое вещество, не менее	5,2 – 5,7	0,6 (ГОСТ 26715)
Массовая доля общего фосфора, % в пересчете на сухое вещество, не менее	5,0 – 5,5	1,5 (ГОСТ 26717)
pH	6,8 – 8,0	5,5 – 8,5 (ГОСТ 26483)

Исследуемый ОСВ представляет собой источник органического азота. Известно, что растениям азот необходим для синтеза белков, участвующих в обменных процессах клеток растений [182]. Основные источники азота растений это соли азотной кислоты и соли аммония. Поступившие в растение минеральные формы проходят сложные превращения на пути образования белка. При этом растение затрачивает большое количество энергии. Внесение удобрения, содержащего свободные аминокислоты (структурные элементы любого белка), дает возможность растению получить молекулу, необходимую для синтеза нужного в данный момент вещества, и не тратить дополнительно время и энергию на питание.

Исследования белковой составляющей ОСВ *Str. chromogenes s.g. 0832*, показали, что она представлена высоким содержанием свободных аминокислот (рис.7.1). Определение растворимого белка, пептидов и аминокислот проводили по [56].

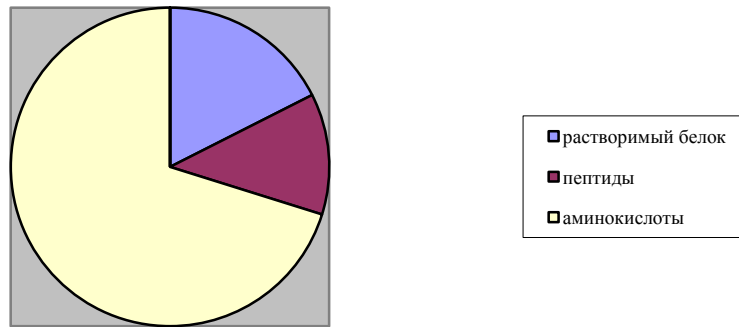


Рисунок 7.1 Фракционный состав белковой составляющей ОСВ
Str. chromogenes s.g. 0832

Аминокислоты имеют огромное значение как факторы роста и представляют собой готовый запас веществ, необходимых для протекания биологических процессов, повышают сопротивляемость к неблагоприятным факторам окружающей среды, незаменимы для качественного образования плодов, повышают уровень усвоения растениями макро- и микроэлементов, ускоряют процесс фотосинтеза [182].

По данным Барболиной[27], триптофан является метаболическим предшественником индолил-3-уксусной кислоты (ИУК) – ауксина, стимулирующего развитие корневой системы растений за счет увеличения всасывающей поверхности корня, уровня минерального питания и устойчивости растений к заболеваниям.

Аминокислотный состав ОСВ *Str. chromogenes s.g. 0832* представлен на рисунке 7.2. Сумма незаменимых аминокислот в ОСВ составляет 41,48 % при этом на долю аргинина, известного как прекурсор полиамидов и усилитель действия регуляторов роста, приходится 7,29%. Из заменимых аминокислот в ОСВ больше всего глутаминовой кислоты (14,7 %) [184]. Она совместно с аспарагиновой отвечает за ассимиляцию азота и синтез белков. Пролин (12,37%) совместно с глицином (4,25%) отвечает за движение воды внутри растения и сопротивляемость растений стрессам.

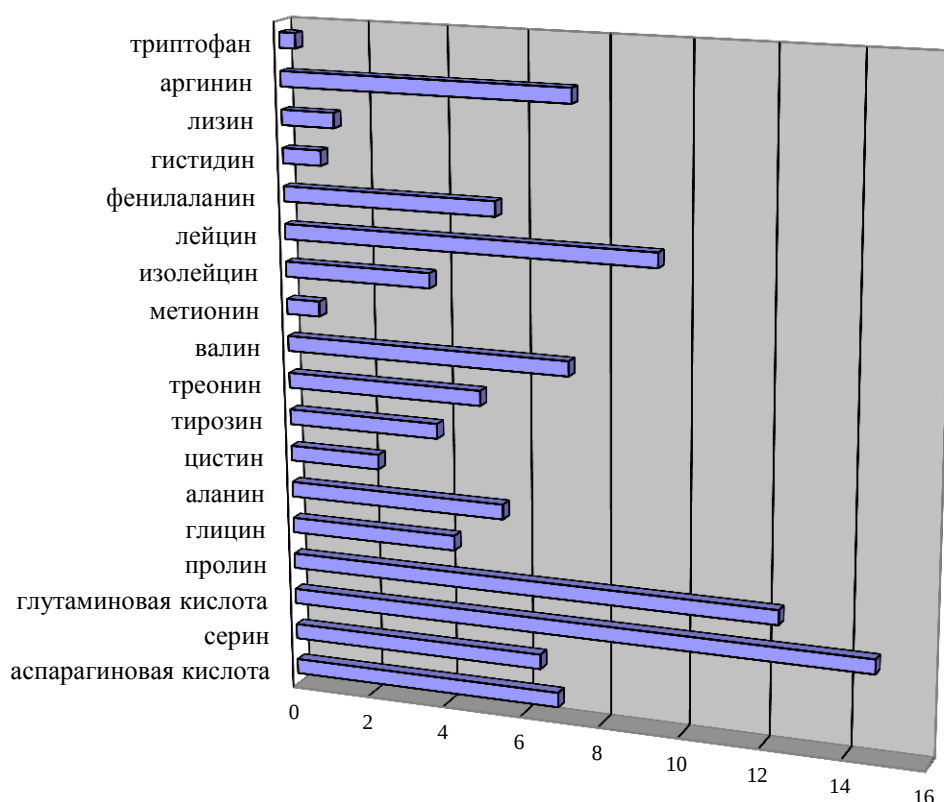


Рисунок 7.2 Аминокислотный состав ОСВ *Str. chromogenes s.g. 0832*

Сдерживающим фактором применения осадков сточных вод в качестве биоудобрений является наличие в них тяжелых металлов [148]. Но по экспериментальным исследованиям, представленным в таблицах 7.1 и 7.2 видно, что предлагаемый образец в качестве биоудобрения удовлетворяет требованиям стандарта.

По содержанию органического вещества полученный ОСВ после биосорбционной очистки стоков превышает нормативное значение в 2,9 раза, азота – в 9,5 раз (табл.7.1). Органическое вещество, вносимое в почву вместе с осадком сточных вод, увеличивает почвенную воду. Это объясняется тем, что в почву дополнительно вносятся спиртовые, фенольные группы, повышающие влагоемкость. Все биоудобрения повышают содержание обменного калия в почве на 45 – 59 % . Сохранение калия в почве в обменной форме при внесении

биоудобрений объясняется экранирующей ролью органического вещества. Калий участвует в синтезе белков, жиров, оптимизации кислотно-щелочного баланса растительных клеток, образовании хлорофилла и ферментов, синтезе целлюлазы и пектиновых веществ, регулировании осмотического давления и водного режима. Кроме того, калий сдерживает поступление радионуклидов в продукты растениеводства [68].

Осадки сточных вод являются стабильным источником пополнения запасов фосфора в почве. Исследуемый ОСВ по содержанию фосфора превышает значение ГОСТ Р 17.4.3.07–2001 «Охрана природы. Требования к свойствам осадков сточных вод при использовании их в качестве удобрений» значение в 3,7 раза (табл.7.1). Высокое содержание элемента можно объяснить активным использованием моющих средств на производстве, а также малой растворимостью и подвижностью в сравнении с калием, который вымывается и уносится очищенными водами. Внесение биоудобрения в почву индуцирует работу многих ферментов, в частности, активизируются кислая и щелочная фосфатазы [182]. Это приводит к повышению содержания доступного фосфора, что в условиях длительного регламентированного внесения осадков может рассматриваться как положительный момент.

Биоудобрения сохраняют или повышают рН почвы, увеличивают нитрифицирующую способность, содержание подвижных фосфатов и обменного калия. Реакция среды (рН) – один из показателей, влияющих на плодородие почвы. Он определяет продуктивность растений, так как обеспечивает подвижность и скорость поступления анионов и катионов в растение. Реакция ОСВ находится в пределах допустимых значений, но ближе к слабощелочной. Это влияет на видовое изменение микроорганизмов в почве: увеличивается число бактерий и уменьшается количество грибов [118]. Регулируя кислотность почвы можно поддерживать на определенном уровне численность соответствующей популяции микроорганизмов в почве [97].

По содержанию тяжелых металлов ОСВ делятся на две группы: I группу составляют осадки с меньшим их содержанием, во II группе их содержание

увеличивается в 2 раза по отношению к I группе. ОСВ, полученный в результате очистки сточных вод *Str. chromogenes s.g. 0832*, по содержанию тяжелых металлов можно отнести к осадкам I группы. Из указанных в стандарте в нем были обнаружены только Zn и Cu. При этом содержание Zn в 7,9 раза ниже допустимого, Cu – в 3,8 раза. Поглощение тяжелых металлов почвами зависит от реакции среды, а также от состава анионов почвенного раствора. Установлено, что в кислой среде преимущественно сорбируют свинец, цинк, медь, в щелочной – кадмий, кобальт. Цинк характеризуется слабой фитотоксичностью, угнетение растений наблюдается при содержании этого элемента свыше 300 мг/кг почвы, медь более токсична и вызывает депрессию микробиологических процессов в почве при концентрации 70 – 384 мг/кг почвы [97].

Наиболее чувствительны к тяжелым металлам бактерии рода *Bacillus*, устойчивы псевдомонады, стрептомицеты [7,97]. Поэтому можно утверждать, что осадок сточных вод, содержащий клетки *Str. chromogenes s.g. 0832*, будет снижать содержание тяжелых металлов, присутствующих в почве.

Таблица 7.2 Содержание тяжелых металлов в ОСВ

Наименование показателя, мг/кг сухого вещества, не более	ОСВ <i>Str. chromogenes s.g. 0832</i>	Осадок группы I	Осадок группы II
Свинец (Pb)	-	250	500
Кадмий (Kd)	-	15	30
Никель (Ni)	-	200	400
Хром (Cr)	-	500	1000
Цинк (Zn)	221	1750	3500
Медь (Cu)	197	750	1500
Ртуть (Hg)	-	7,5	15
Мышьяк (As)	-	10	20

Известно, что внесение органических удобрений значительно стимулирует синтез почвенными микроорганизмами витаминов группы «В».

Внесение биоудобрения обеспечивает повышение содержание биотина в 5–10 раз, никотиновой кислоты – в 3–6 раз, пиридоксина – в 2–3 раза [27].

В составе осадка сточных вод обнаружены растворимые соединения, которые подавляют рост ряда фитопатогенных микроорганизмов: *Fusarium oxisporum*, *F. solani*, *F. culmorum* (возбудители корневых гнилей растений); *Verticillium dahliae* (возбудитель вертициллезного увядания) [17].

Было установлено, что культуры микроорганизмов, выделенные из биоудобрений, обладают высокой антибиотической активностью и сдерживают рост патогенной микрофлоры более чем на 50 % [16].

Биоудобрения подавляют рост и развитие патогенных грибов, вызывающих такие болезни, как фузариоз, корневые и стеблевые гнили.

Анализ ОСВ показал, что его микрофлора представлена грибами, бактериями и актиномицетами. Доминирующей формой являются бактерии. В сырой биомассе осадка от 1,3 до $4,4 \cdot 10^8$ экз./1г биомассы. Это на три порядка выше содержания грибов [7].

В состав бактериального пула в основном входят бактерии рода *Bacillus*, *Pseudomonas*, грибы родов *Fusarium*, *Mucor*, *Penicillium sp* [97].

Количество актиномицетов в осадке определяется очень редко. Это связано с тем, что их численность достигает заметных значений лишь спустя три и более месяцев, и превышает содержание грибов в 10 – 100 раз [97]. К этому времени в осадке, вносимом в почву, исчезают легко минерализуемые органические вещества и остаются трудноразлагаемые биополимеры, разрушить которые могут актиномицеты. Высокой активностью в этом отношении обладают роды *Streptomyces*, *Micromonospora* [102].

Внесение осадка сточных вод способствует поддержанию пула метаболитов на определенном уровне в почве. Вместе с осадком в почву поступают гидролитические ферменты *Str. chromogenes s.g. 0832*. Пул этих ферментов (протеаза, кератиназа) гидролизует сложные органические вещества почвы, пополняя тем самым пул простых органических веществ. Благодаря

этому увеличивается уровень популяционной плотности актиномицета и поддерживается длительное время на высоком уровне.

Таким образом, проведенный анализ позволяет сделать вывод о возможности использования ОСВ, полученного после биосорбционной очистки сточных вод *Str. chromogenes s.g. 0832*, в качестве органического удобрения.

7.2. Использование осадка сточных вод в качестве органического удобрения

Сравнительный анализ данных ОСВ и ГОСТ Р 17.4.3.07–2001 «Охрана природы. Требования к свойствам осадков сточных вод при использовании их в качестве удобрений» свидетельствует о том, что предлагаемый ОСВ в качестве биоудобрения может использоваться в количестве не более 10 т сухой массы осадв или компостов на их основе с периодичностью 5 лет. В связи с этими рекомедациями ОСВ вносили осенью под вспашку в количестве 5т/га сухого вещества.

При использовании ОСВ в качестве удобрений необходимо учитывать экологические последствия от его внесения в почву[241]. Поэтому в первую очередь важно определить токсичность почвы в зависимости от внесения ОСВ.

Интегральную оценку токсичности почвы дает метод биотестирования[155]. Степень токсичности почвы определяется по реакции живых организмов-биотестеров (животные, растения, микроорганизмы). Чаще всего используются проростки растений. Прорастание семян – наиболее чувствительный этап развития высших растений. В этот период отмечается максимальная реакция растения на факторы окружающей среды. Фитотоксичность почвы определяется сравнением показателей прорастания семян под действием вытяжки из исследуемого образца почвы и контроля [97]. В качестве биотеста использовали семена рапса (сорт Ратник). Результаты эксперимента представлены в таблице 7.3.

Таблица 7.3 Токсичность почвы при внесении ОСВ

Вариант	2011г.		2012г.		2013г.		2014г.		2015г.	
	Длина корня ,мм	Всхожесть семян, %	Длина корня ,мм	Всхожесть семян, %	Длина корня ,мм	Всхожесть семян, %	Длина корня ,мм	Всхожесть семян, %	Длина корня ,мм	Всхожесть семян, %
Контроль	2,3	98,1	2,5	98,0	2,3	97,7	2,4	97,9	2,3	97,3
ОСВ	2,8	99,3	2,8	98,6	2,6	98,7	2,7	98,7	2,5	98,4

Всхожесть семян рапса показывает низкий уровень фитотоксичности почвы с внесением ОСВ во всех образцах. Порог токсичности 20% не превышен [97]. Наименьший показатель фитотоксичности отмечен в 2011г. Длина корней семян превысила контрольные образцы на 22%. В последующие годы все опытные образцы превышали контрольные, но наблюдалась тенденция к снижению роста корней, и в 2015г разница с контрольными образцами составила лишь 8,7%. Вероятно это связано с более высоким содержанием органического вещества в почве в первый год внесения биоудобрения.

Внесение ОСВ в качестве биоудобрения оказывало положительное влияние на содержание органического вещества в почве. В первый год после внесения ОСВ его содержание увеличилось на 6,8 % в сравнении с контролем (табл.7.4).

Таблица 7.4 Содержание органического вещества в почве (0 – 20 см),%

Вариант	Сроки отбора образцов почвы				
	05.2011	05.2012	05.2013	05.2014	05.2015
Контроль	3,70	3,70	3,65	3,63	3,60
ОСВ	3,95	3,87	3,83	3,76	3,74

Такое высокое содержание органической составляющей объясняется увеличением доли азота, источником которого является ОСВ. В дальнейшем происходит разложение сложных органических соединений и высвобождение

легкоусвояемых форм элементов питания, и как следствие – снижение содержания органического вещества (табл.7.5).

Процесс трансформации органического вещества в почве контролируется микроорганизмами. Внесение ОСВ повышает ферментативную активность почвы за счет увеличения количественного и качественного состава микрофлоры. Ферментативная активность почвы позволяет судить о биохимических процессах, протекающих в ней. В основном это разложение органических растительных остатков, которое протекает при участии гидролаз и оксиредуктаз. Их активность является существенным показателем плодородия почв. Чаще всего ферментативная активность почвы определяется по каталазной активности. Фермент каталаза участвует в биологическом окислении и связан с процессами дыхания живых организмов, обитающих в почве. Установлена корреляционная связь между активностью каталазы и численностью микроорганизмов [12,83,224].

Результаты проведенных исследований показали, что активность каталазы при внесении ОСВ была выше в сравнении с контролем на протяжении всего эксперимента (рис.7.3).

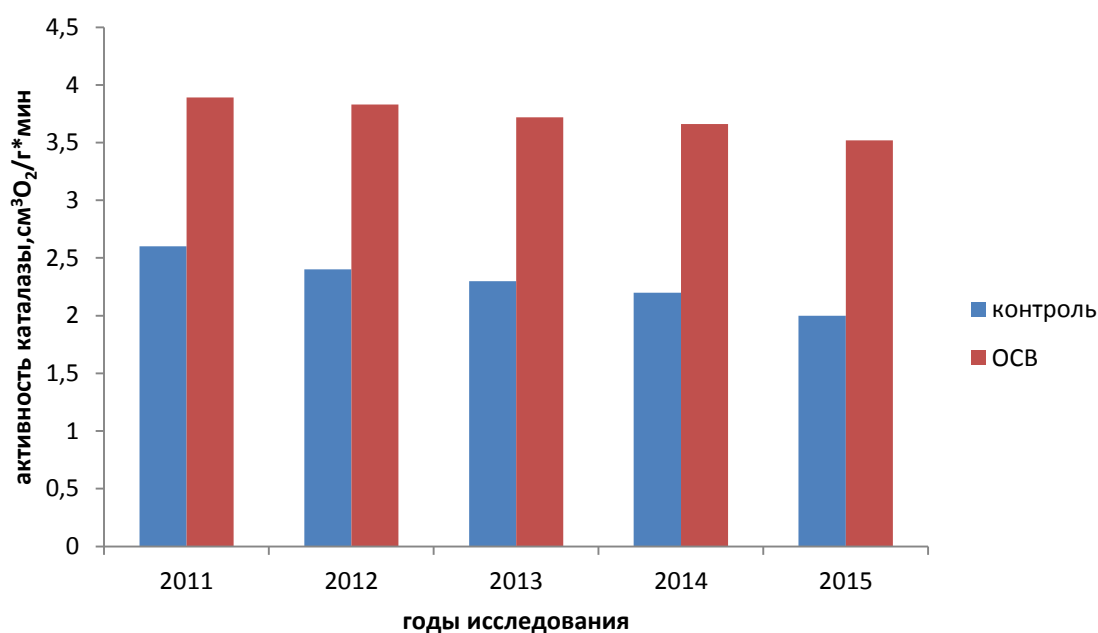


Рисунок 7.3 Ферментативная активность почвы

Это свидетельствует о том, что органическое вещество ОСВ активизирует микробиологические процессы в почве. Следует обратить внимание на тот факт, что в период исследования каталазная активность в контрольном образце снизилась на 23%, в то время как в опытном – лишь на 9,5%. Таким образом, ОСВ активизирует развитие микроорганизмов, улучшая тем самым структуру почвы. Обильные осадки и высокая температура в 2012 г. оказали благоприятное влияние на деятельность микроорганизмов, и их ферментативная активность была максимальной в сравнении с другими годами эксперимента.

Одним из показателей, отражающим удобрительную ценность ОСВ является микробная биомасса. Она отражает уровень трансформации органики в почве [182]. Определение микробной биомассы проводили в почве после внесения ОСВ в модельном опыте. Опыт показал, что микробная биомасса в образце почвы с ОСВ увеличивалась интенсивно в течение 60 дней, максимальное её значение было достигнуто на 50 сутки. В то время как в контрольном образце наибольшее накопление биомассы соответствовало 30 суткам эксперимента, и было ниже оптимального значения в 4,5 раза (рис.7.4). Это можно объяснить тем, что с внесением ОСВ в почву поступают дополнительно микроорганизмы, которые активно включаются в биохимический цикл почвенного сообщества. Доминирующим микроорганизмом в ОСВ является *Str. chromogenes* s.g 0832, который, как уже упоминалось ранее, проявляет высокую протеолитическую активность, участвуя в процессах биоконверсии органических веществ.

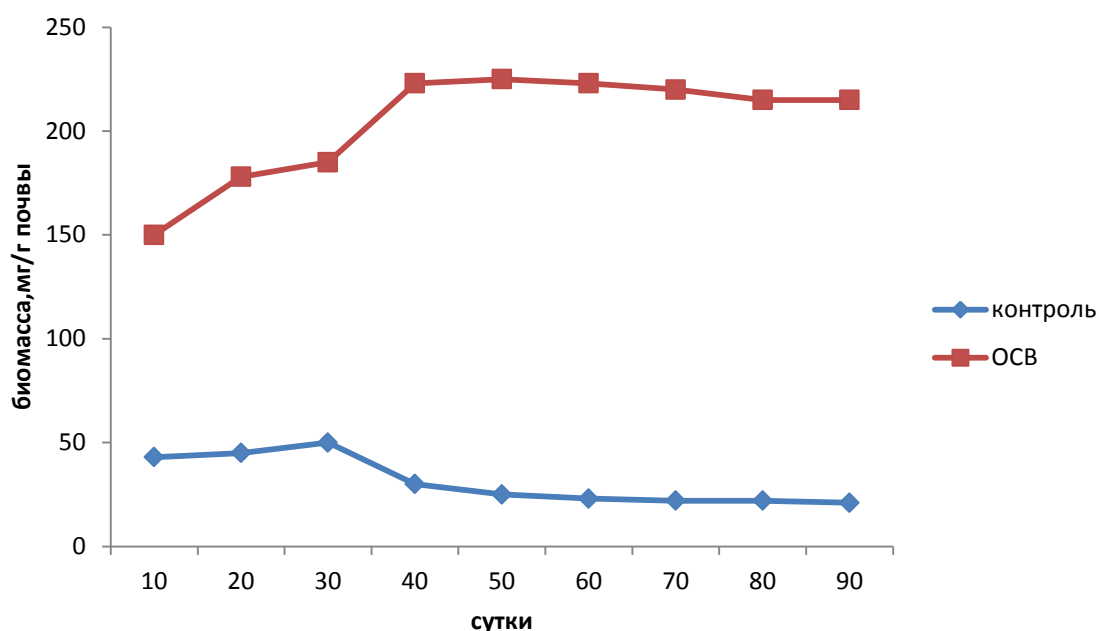


Рисунок 7.4 Динамика накопления биомассы

Активная деятельность микроорганизмов способствует быстрой минерализации органического вещества осадка сточных вод при внесении в почву. При этом гидролитическому расщеплению, прежде всего, подвергаются азотсодержащие соединения. Возрастает концентрация доступного для растений азота. Следует учитывать и тот положительный факт, что в вносимом в почву ОСВ содержание тяжелых металлов минимально, и представлено цинком и медью, и не будет ингибировать биодоступность ряда важных элементов питания для растений [182].

Исследования по внесению ОСВ в агроценозы рапса показали положительное изменение основных агрохимических показателей чернозема выщелоченного (табл.7.6).

Содержание подвижного фосфора при внесении ОСВ было выше контрольных образцов на 13,5% (2011 г.). В дальнейшем под культурой запасы подвижного фосфора уменьшались, как в опытном, так, и в контрольном образцах (2012,2013 г.г.), что связано с поглощением фосфора растениями.

В 2014, 2015 г.г. при недостатке влаги в почве высвобождаются активные места на поверхности коллоидных и др. частиц, которые замещаются фосфат-

ионами [97], что привело к повышению содержания подвижного фосфора в почве контрольного образца.

Таблица 7.6 Динамика агрохимических показателей почвы в агроценозах рапса на VIII этапе органогенеза

Вариант	P ₂ O ₅	K ₂ O	N
2011 г.			
Контроль	108,7	105,4	0,20
ОСВ	123,4	95,7	0,26
2012 г.			
Контроль	102,7	95,7	0,19
ОСВ	98,6	93,9	0,23
2013 г.			
Контроль	100,4	93,9	0,19
ОСВ	95,6	91,6	0,21
2014 г.			
Контроль	103,8	110,9	0,19
ОСВ	93,9	97,4	0,20
2015 г.			
Контроль	101,5	111,3	0,19
ОСВ	93,2	98,7	0,20

В почвах с добавлением ОСВ в этот же период исследования содержание подвижного фосфора продолжало снижаться, что можно объяснить повышенной деятельностью микроорганизмов, способствующей увеличению доступности растениям фосфора почвы [94].

Содержание калия под культурой рапса на протяжении 2011 – 2013 гг. снижалось и в контрольных, и в опытных образцах. Его усвояемость растениями на почвах с ОСВ была выше на 9,3% в 2011г. и на 2 – 2,5% – в 2012,2013 гг. соответственно.

В 2014, 2015 гг. содержание подвижных форм калия в почве контрольного и опытного образцов возрастает. В.Д.Панников, В.Г. Минеев отмечают, что в черноземах с высоким содержанием двухвалентных катионов обменный калий практически не накапливается. Преобладает необменное поглощение калия, которое обуславливается, в частности, большим количеством органического вещества [172].

Таким образом, внесение в почву ОСВ, полученного в результате очистки сточных вод *Str. chromogenes s.g 0832*, улучшает основные показатели почвы. Для подтверждения этого вывода были проведены исследования по влиянию ОСВ на урожайность рапса. Результаты эксперимента представлены в таблице 7.7.

Таблица 7.7 Основные элементы структуры урожайности и высота растений ярового рапса

Вариант	2011г.		2012г.		2013г.		2014г.		2015г.	
	Высота растения, см	Урожайность, ц/га	Высота растения, см	Урожайность, ц/га	Высота растения, см	Урожайность, ц/га	Высота растения, см	Урожайность, ц/га	Высота растения, см	Урожайность, ц/га
Контроль	107	19,2	109	20,5	108	19,5	106	19,4	106	19,3
ОСВ	120	26,3	123	27,5	120	25,8	118	25,3	115	24,2

Проведенные исследования показали, что выращивание растений на почвах с добавлением ОСВ положительно влияет на урожайность рапса. Его продуктивность возросла в среднем за рассматриваемый период на 31,6%. Максимальная урожайность была отмечена в 2012 г. Рапс предъявляет повышенные требования к влаге, особенно в начальные периоды роста [97]. Климатические условия 2012 г. были наиболее благоприятными для развития данной культуры. Кроме того, внесение в почву ОСВ позволило поддерживать активное функционирование почвенно-климатического комплекса. В первые 20–30 дней всходы рапса росли медленно и на контрольном, и на опытном вариантах. Но улучшение питательного и водного режима на почвах с

внесением ОСВ существенно влияло на урожайность рапса. Высота растений на почвах с ОСВ превышала контрольные образцы на 8 – 13 %.

При использовании ОСВ густота посева уменьшилась на 21шт/м², хотя норма высева была одинаковой. Очевидно, что ОСВ увеличивает высоту, облиственность и ветвистость рапса, что усиливало взаимозатенение их в посевах. Это приводило к гибели более слабых растений. При этом число стручков на растении увеличилось на 30 %, масса 1000 семян также была выше на почвах с ОСВ (табл.7.8).

Таблица 7.8 Влияние ОСВ на основные характеристики ярового рапса

	Число растений в посевах перед уборкой, шт/м ²	Число стручков на 1 растение, шт	Число семян в стручке, шт	Масса 1000 семян, г
Контроль	148	20	19	2,75
ОСВ	127	26	23	2,94

Проведенные исследования позволяют судить о том, что на протяжении эксперимента культура рапса в процессе онтогенеза подвергалась интенсивному антропогенному воздействию (в виде внесения ОСВ в почву). При этом полученные высокие значения уровня продуктивности растения свидетельствуют о стабильности агроэкосистемы после внесения ОСВ. В ходе эксперимента повысилось содержание органического вещества, фосфора, увеличилась микробная биомасса, возросла биологическая активность почвы. Стоит обратить внимание на тот факт, что незначительные изменения энергетических взаимодействий в почве после внесения осадка сточных вод могут регулировать большие потоки энергии и вещества в агроэкосистемах. Это ещё раз подтверждает, что «в управлении большими потоками энергии в агроэкосистемах роль модуляторов выполняют малые потоки энергии» [97].

Полученные результаты показали реальную возможность утилизации ОСВ, образующегося после очистки стоков мясокомбинатов *Str. chromogenes* s.g 0832, в качестве удобрения, и обеспечивает увеличение урожая выращиваемых культур при отсутствии негативного воздействия на

агрохимические показатели почвы. В целях повышения плодородия почвы и урожайности сельскохозяйственных культур можно рекомендовать использовать ОСВ как биоудобрение в норме 5т/га, что не приведет к загрязнению почв тяжелыми металлами выше допустимых уровней.

7.3 Эколого-экономическое обоснование способа биосорбционной очистки сточных вод

Автором была проведена оценка безотходности производств мясной промышленности по эффективности использования водных ресурсов [45,49,119,120,122]. Результаты расчета коэффициента экологичности ($K_э$), представленные в таблице 7.9, показывают, что по всем видам загрязнений на всех производствах рассматриваемой отрасли $K_э > 1$, то есть, наносится существенный вред окружающей среде.

Таблица 7.9 Оценка состава сточных вод по показателю экологичности

Среднестатистические показатели загрязнений	$K_{факт}$, мг/дм ³	ПДС, мг/дм ³	$K_э$
Мясокомбинаты			
Взвешенные вещества	1800	200,0	9,00
Хлориды	2100	300,0	7,00
Фосфор	60	3,3	18,18
Азот аммонийный	57	16,5	3,50
Жир	1500	30,0	50,00
Железо общее	20	3,3	6,15
Сульфаты	500	100,0	5,00
БПК	1800	330,0	5,46
ХПК	3000	440,0	6,80
Мясоперерабатывающие заводы			
Взвешенные вещества	2000	160	12,5
Хлориды	1300	60	21,7
Фосфор	60	5	12,0
Азот аммонийный	62	18	3,4
Жир	2800	60	46,7
Железо общее	20	6	3,3
Сульфаты	500	80	6,3
БПК	1600	300	5,3
ХПК	2500	500	5,0

Окончание таблицы 7.9

Птицекомбинаты			
Взвешенные вещества	800	150	5,30
Хлориды	550	40	13,75
Фосфор	60	5	12,00
Азот аммонийный	11	10	1,10
Жир	200	30	6,70
Железо общее	20	5	4,00
Сульфаты	500	80	6,25
БПК	750	300	2,50
ХПК	2000	500	4,00

По показателю полноты использования сточных вод (K_m) все предприятия относятся к рядовым, то есть применяемые технологии на них нельзя отнести к разряду мало- и безотходных технологий (табл. 7.10). Показатель безотходности производства (K_6) для всех предприятий невысокий, но наиболее приближенным к малоотходным производствам можно считать мясоперерабатывающие предприятия (табл. 7.10).

Полученные результаты показали, что производства мясной промышленности не удовлетворяют экологическим требованиям, т.е. используемые воды для технологических нужд после применения в технологическом процессе представляют серьезную угрозу окружающей среде, особенно по содержанию белка, жира, фосфора, хлоридов, т.е. существующие технологии по использованию водных ресурсов далеки от мало- и безотходных технологий.

Таблица 7.10 Оценка предприятий мясной промышленности с экологических позиций

Предприятия и их мощность	Расход потребляемой свежей воды на 1 т выпускаемой продукции, Q (м ³)	Образование сточных вод при производстве 1 т продукции, V (м ³)	Безвозвратные потери воды на 1 т продукции, V _п (м ³)	K _м	K _{э.общ.}	K _б
Мясокомбинаты производительностью, т в смену						
до 10	21,5	19,3	2,2	0,10	12,3	0,1
от 10 до 30	22,4	20,3	2,1	0,09		0,1
от 30 до 50	22,7	19,3	2,4	0,11		0,1
от 50 до 100	25,0	21,3	3,7	0,15		0,2
Мясоперерабатывающие заводы производительностью, т в смену						
до 20	19,4	13,6	5,8	0,29	12,9	0,3
от 20 до 40	21,5	15,0	6,5	0,30		0,3
Птицекомбинаты производительностью, т в смену						
до 15	40,0	36,0	4,0	0,10	6,2	0,1

Эффективность способов очистки отработанных технологических жидкостей была оценена по удельным эксплуатационным затратам (себестоимость очистки) (S), определяемым отношением годовых эксплуатационных расходов (P) к годовому количеству стоков (Q), прошедших через очистные сооружения.

Для характеристики работоспособности очистных сооружений применяли показатель – удельные эксплуатационные затраты на 1 кг БПК (или 1 кг ХПК) $C_{\text{БПК}}$, $C_{\text{ХПК}}$ [69]:

$$C_{\text{БПК}} = S / (\text{БПК}^{\text{стока}} - \text{БПК}^{\text{очищ}}), \text{ руб/ 1 кг БПК},$$

$$C_{\text{ХПК}} = S / (\text{ХПК}^{\text{стока}} - \text{ХПК}^{\text{очищ}}), \text{ руб/ 1 кг ХПК}.$$

Фактическая стоимость удаления загрязнений представлена в таблице 7.11.

Таблица 7.11 Эффективность способов очистки сточных вод

Способ очистки	Себестоимость очистки, S , руб/м ³	$C_{\text{БПК(ХПК)}}$, руб/1кг БПК(ХПК)	Годовые эксплуатационные расходы, P , руб	Годовое количество сточных вод, Q , м ³	БПК (ХПК) стока, мгО ₂ /дм ³	БПК (ХПК) очищен., мгО ₂ /дм ³	K_3
Отстаивание (фильтрация)	1,4	0,002 (0,0014)	250 000	175000	1500 (2500)	600-900 (1000-1500)	2,1 (2,1)
Коагуляция (флокуляция)	7,1	0,005-0,007 (0,003-0,004)	1 250000	175000	1500 (2500)	150-450 (250-750)	0,86 (0,4)
Обратный осмос (ультрафильтрация)	14,3	0,01 (0,006)	2 500000	175000	1500 (2500)	30-75 (50-125)	0,15 (0,07)
Сорбция	5,7	0,005 (0,003)	1 000000	175000	1500 (2500)	150-450 (250-750)	0,86 (0,4)
Биологическая	7,4	0,005 (0,003)	1300000	175000	1500 (2500)	75-150 (125-250)	0,3 (0,3)
Биофлокуляция (биосорбция)	7,4	0,005 (0,003)	1 300000	175000	1500 (2500)	30-75 (50-125)	0,15 (0,07)

Расчет коэффициента экологичности $K_э$ для каждого способа очистки определяли по формуле:

$$K_э = \text{БПК}_{\text{очищен.}} / \text{БПК}_{\text{доп.}}, \text{ или}$$

$$K_э = \text{ХПК}_{\text{очищен.}} / \text{ХПК}_{\text{доп.}},$$

где $\text{БПК}_{\text{очищен.}}$ ($\text{ХПК}_{\text{очищен.}}$) – фактическое значение БПК (ХПК) после очистки стока соответствующим методом, $\text{БПК}_{\text{доп.}}$ ($\text{ХПК}_{\text{доп.}}$) – допустимое значение БПК(ХПК) при сбросе отработанных вод в городскую канализацию. По проведенным расчетам можно сделать следующее заключение: наименьший вред окружающей среде будет нанесен после очистки стоков ультрафильтрацией, обратным осмосом и биофлокулянтами.

Предотвращенный ущерб окружающей среде ($Y_{\text{пр}}$) определяли по укрупненной оценке ущерба при загрязнении сточными водами водных объектов по формуле [69]:

$$Y_{\text{пр}} = Y_{\text{п}} - Y_{\text{ф}}, \quad (7.1)$$

где $Y_{\text{п}}$ – потенциальный ущерб, причиняемый водоемам при сбросе неочищенных сточных вод; $Y_{\text{ф}}$ – фактический ущерб.

$$Y_{\text{п}} = (Q \cdot \beta_1 \cdot N \cdot y) / 10^6, \quad Y_{\text{ф}} = (Q \cdot \beta_2 \cdot N \cdot y) / 10^6, \quad (7.2)$$

где Q – расход сточной воды, м³/год (в нашем случае принимаем 75000 м³/год);

β_1, β_2 – коэффициенты кратности разбавления неочищенного стока;

N – число дней в году (258);

y – удельный показатель предотвращенного ущерба, наносимого водоему сточными водами (1 млн.м³ ст.вод в год), принимаемый согласно методике расчета 1440 руб.

$$\beta_1 = C_1 / C_{\text{н}} \quad \beta_2 = C_2 / C_{\text{н}}, \quad (7.3)$$

где C_1 – исходная концентрация загрязняющего вещества в стоке (табл.6.12);

C_2 – концентрация загрязняющего вещества после очистки (табл. 6.12, 6.13);

$C_{\text{н}}$ – концентрация загрязняющего вещества по нормативу (табл. 6.12).

Расчет представлен в таблице 7.12. По результатам расчета можно сделать вывод, что фактический ущерб по предлагаемым технологиям

очистки сточных вод меньше в 23,5 – 39,2 раза по сравнению с традиционной биологической очисткой стоков. Это позволит предотвратить более чем в 2 раза ущерб окружающей среде (ОС). Использование актиномицетов, и в частности *Str. chromogenes s.g 0832*, в качестве биофлокулянта создает условия для очистки специфичных сточных вод, а именно сточных вод мясной промышленности. Рассматриваемый микроорганизм, его ферментные системы проявляют максимальную активность в отношении белков, находящихся в мясных стоках.

Таблица 7.12 Укрупненная оценка ущерба при загрязнении сточными водами

Показатели состава сточных вод, мг/дм ³	У _п , р/г Неочищенный сток	У _ф , р/г Биологическая очистка предприятия	У _ф , р/г Очистка Str.chr.s.g.0 832	У _п , р/г Очистка Str.chr.s.g.0 832 + Al ³⁺	У _ф , р/г Очистка Str.chr.s.g.0832+ ПАА	У _{пр} , р/г Очистка Str.chr.s.g.0832+ УЗ
ХПК	52941,6	557,3	5875,3	4736,9	3813,4	3526,8
Взвешенные вещества	351086,4	13932,0	16532,6	13096,1	10774,1	9845,3
БПК	80805,6	835,9	5077,4	4179,6	3312,7	3034,1
Хлориды	61300,8	33436,8	851,8	696,6	557,3	509,5
Сульфаты	5572,8	4736,9	457,0	362,2	295,4	273,1
Сухой остаток	84706,6	48483,4	579,6	473,7	379,0	345,5
Азот аммонийный	429105,6	25913,5	1671,8	1393,2	1114,6	975,2
Азот нитратов	402634,8	661770,0	2507,8	1950,5	1671,8	1671,8
Азот нитритов	3343,7	3622,3	83,6	66,9	55,7	50,2
Жиры	12538,8	975,2	125,4	97,5	83,6	8,4
Итого фактический ущерб ОС	1 484 036,7	794 263,3	33 762,3	27 053,2	22 057,6	20 239,9
Итого предотвращенный ущерб ОС, У _{пр} , р/г		689 773,4	1450274,4	1456983,5	1451979,1	1463796,8

Сравнительная характеристика эффективности очистки предлагаемым актиномицетом и другими известными флокулянтами и сорбентами,

показала, что *Str. chromogenes* s.g 0832 способен работать самостоятельно, а не как дополнительный биосорбент в очистке сточных вод (характерно для всех известных флокулянтов).

Предложенная технологическая схема очистки сточных вод позволяет довести содержание вредных веществ в них до таких минимальных значений, что позволит использовать очищенную воду повторно в замкнутом цикле. Образующийся после такого способа очистки осадок может эффективно применяться в качестве удобрения, что обеспечит увеличение урожая выращиваемых культур при отсутствии негативного воздействия на агрохимические показатели почвы. Реализация такого биотехнологического способа очистки сточных вод представляет собой безотходную и экологически безопасную технологию, внедрение которой дает большие возможности российскому рынку.

ВЫВОДЫ И ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1 Проведенный анализ состава сточных вод предприятий мясной промышленности показал, что наиболее эффективным методом их очистки является биологический. Популяция актиномицетов наиболее эффективна для очистки сточных вод, содержащих органические примеси. Из 50 проверенных штаммов микроорганизмов протеолитическая активность была обнаружена у 96%. Установлена прямая зависимость между общей протеолитической (гидролитической) активностью и флокулирующим эффектом.

2 На скорость роста популяции *Str. chromogenes s.g. 0832* влияют картофельный крахмал, такие источники органического азота, как кератин (перо, волос, рога), соевая мука. Установлено, что они выступают индукторами биосинтеза ферментов. Наибольшую специфичность *Str. chromogenes s.g. 0832* проявляет к кератину пера. К 48 часам биосинтеза в растворимую форму переходит 84% пера.

3 Определены оптимальные условия, при которых ферменты *Str. chromogenes s.g. 0832* проявляют максимальную активность: pH 7,0-9,0; t=30-50⁰С, позволяющие проводить глубокий гидролиз белков. Выявлена зависимость активности ферментов от ионов Ca²⁺. В их присутствии глубина гидролиза увеличивается на 27%.

4 *Streptomyces hromogenes s.g. 0832* проявляет хорошие флокулирующие свойства не только по отношению к белковой составляющей стока, но и весьма эффективно удаляет из сточных вод жир, железо и может рассматриваться как флокулянт для очистки сточных вод мясной промышленности широкого спектра, обеспечивая очистку стока на уровне ПДК и ниже по основным показателям, характеризующим эффективность водоочистки: мутность (58,7 %), содержание общего железа (91,1 %), ХПК (91,3 %).

- 5 Актиномицет *Str. chromogenes* s.g. 0832 вполне конкурентоспособен современным синтетическим аналогам и может применяться для очистки сточных вод от органических загрязнителей.
- 6 На основании экспериментальных данных разработана математическая модель очистки сточных вод *Str. chromogenes* s.g. 0832, позволяющая упростить технологию водоочистки, повысить её экологическую безопасность.
- 7 По содержанию Zn и Cu осадок сточных вод ниже ПДК в 3,8 - 7,9 раза. По содержанию органического вещества превышает нормативное значение в 2,9 раза, азота – в 9,5 раз.
- 8 Использование осадка сточных вод в агроценозах рапса позволяет повысить биологическую активность почвы, продуктивность агроценоза рапса возросла на 31,6%.
- 9 Предотвращенный ущерб окружающей среде в результате внедрения предлагаемого способа очистки сточных вод для предприятия с расходом сточных вод 75000 м³/год, составит от 1 450 274,4 до 1 463 796,8 рублей в год в зависимости от способа очистки.

Предложения производству

- 1 Разработанную биосорбционную технологию очистки сточных вод рекомендуется внедрять на предприятиях мясной промышленности и животноводческих комплексах в оборотном водоснабжении.
- 2 Осадок сточных вод может использоваться в агроэкосистемах Центрального Черноземья, обеспечивая повышение продуктивности посевов на 30 и более процентов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абрамович И.А. Обоснованность нормативных требований к качеству очистки сточных вод / И.А. Абрамович // Водоснабжение и санитарная техника. – 1996. – № 1 – С.14-21.
2. Абрамович С.Ф. Тенденции развития водоснабжения городов зарубежом / С.Ф. Абрамович, Я.Д. Раппорт. – Москва: ВНИИС, 1997. – 233 с.
3. Аграноник Р.Я. Технология обработки осадков сточных вод с применением центрифуг и ленточных фильтр-прессов / Р.Я. Аграноник. – Москва: Стройиздат, 1985. – 144 с.
4. Аджиенко В.Е. Исследование процесса аэробной стабилизации избыточного активного ила / В.Е. Аджиенко, Д.А. Данилович, Ф.А.Дайнеко // Вода и экология. – 2000. – № 3. – С. 59-70.
5. Акимов Л.М. Многолетние изменения температуры воздуха города Воронежа во второй половине 20 века / Л.М. Акимов // Вестник Воронежского государственного университета. Сер. География. Геоэкология. – 2009. – №2. – С.137-141.
6. Акимов Л.М. Пространственновременные закономерности атмосферных засух на территории Воронежской области в вегетационный период/ Л.М. Акимов// Аридные экосистемы.- Москва: Товарищество научных изданий КМК, 2013. – Т.19, №2. – С.15-20.
7. Алексеева А.С. Влияние применения нетрадиционных органических удобрений на накопление тяжелых металлов и биологическую активность дерново-подзолистых супесчаных почв: автореф. дисс. ... канд. биол. наук/ А.С. Алексеева. – Москва: МГУ, 2002. – 23с.
8. Алещенкова З.М. Влияние микроорганизмов-деструкторов на очистку в активном иле сточных вод производства лавсана / З.М. Алещенкова, А.С. Самсонова, Н.Ф. Семочкина // Прикл.биохимия и микробиология. - 1999. – Т. 35, №4. – С. 448-451.

9. Алещенкова З.М. Интенсификация биологической очистки сточных вод производства лавсана микроорганизмами-деструкторами, внесенными в активный ил / З.М. Алещенкова, А.С. Самсонова, Н.Ф. Семочкина // Биотехнология. – 1997. – №3. – С. 48-52.
10. Алещенкова З.М. Микробная очистка сточных вод производства пластификаторов / З.М. Алещенкова, А.С. Самсонова, Н.Ф.Семочкина // Биотехнология. – 1997. – №5. – С. 39-42.
11. Ананьева Л.Н. Снижение антропогенных выбросов мясоперерабатывающих предприятий путем целенаправленной переработки жидких отходов/ Л.Н. Ананьева, Л.В. Брындина // Экология ЦЧО РФ Научно-технический журнал по проблемам экологии, охраны окружающей среды и рационального природопользования. – 1999. – №2. – С.100-102.
12. Андреюк Е.М. Некоторые аспекты взаимосвязи между биологической активностью почвы, количеством микроорганизмов и внешними факторами /Е.М. Андреюк// Труды института экспериментальной биологии АН СССР. – НАККИ, 1974. – Ч.1. – С. 126-129.
13. Антонов В.К. Химия протеолиза / В.К. Антонов. – Москва: Наука, 1983. – 367с.
14. Анцыпович И.С. Охрана окружающей среды на предприятиях мясной и молочной промышленности / И.С. Анцыпович, Л.Я. Попенко. – Москва: Агропромиздат, 1986. – 255с.
15. Апсеметов А.Т. Разработка высокоинтенсивного аппарата совмещенного действия для очистки сточных вод от взвешенных частиц: дис. ...канд.техн.наук: 05.17.08: защищена 17.05.96/ А.Т. Апсеметов. – Шымкент: КазХТИ, 1996. – 156с.
16. Архипченко И.А. Биотрансформация азотсодержащих соединений в процессе непрерывной доочистки стоков свиногокомплексов иммобилизованными клетками / И.А. Архипченко, Г.А. Гусарова, Н.С. Паников // Микробиология. – 1996. – Т. 65, № 5. – С. 621-626.

17. Архипченко И.А. Бамил: биологически активное удобрение / И.А. Архипченко // Наука в России. – 1997. – №5. – С.17-20.
18. Архипченко И.А. Полифункциональные микробные удобрения / И.А. Архипченко // Наука в России. – 1999. – №6. – С.62-64.
19. А.с. 1565888 СССР, МПК C12N9/50. Способ получения кератиназы / Н.А. Жеребцов, Л.В. Насонова (СССР). – № 4358177/30-13; заявл. 08.12.87; опубл. 23.05.90, Бюл.№ 19.
20. Асминин В.Ф. Экологические проблемы очистки сточных вод мясоперерабатывающей промышленности / В.Ф. Асминин, Л.В. Брындина // Труды 6-ой международной научно-практической конференции «Высокие технологии в экологии» / Воронежское отделение Российской Экологической академии, 21-23 мая. – Воронеж, 2003. – С.192-195.
21. Асминин В.Ф. Интенсификация процесса очистки сточных вод / В.Ф. Асминин, Л.В. Брындина // Труды 7-ой международной научно-практической конференции «Высокие технологии в экологии» / Воронежское отделение Российской Экологической академии, 19-21 мая. – Воронеж, 2004. – С.166-168.
22. Багаева Т.В. Поиск новых перспективных форм биофлокулянтов / Т.В. Багаева, Е.Е. Зинурова // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. – 2008. – Т.150, кн.2. – С. 8 - 21.
23. Бабенко Ю.Д. Очистка воды коагулянтами /Ю.Д. Бабенко. – Москва: Наука, 2000. – 478с.
24. Бакулин М.К. Оптимизация биотехнологического процесса выращивания актиномицетов с использованием перфторуглеродов / М.К. Бакулин, А.С. Кучеренко, Н.А. Кривошеина // Наука-производство-технологии-экология: сборник материалов Всероссийской научн.-техн. конференции. – Киров. – 2003. – Т.3. – С. 90-91.
25. Банникова О.М. Получение и использование биокоагулянта для очистки промышленных сточных вод и утилизации полученного осадка / О.М. Банникова, Г.А. Козлова // Эколог.безопас.населения в зонах

градопром.агпомераций Урала: тез.докл. регион. научн.-техн. конференции. – Пермь. – 1995. – С. 15-16.

26. Баран А.А. Флокуляция дисперсных систем водорастворимыми полимерами и ее применение в водоочистке / А.А. Баран, И.М. Соломенцева // Химия и технология воды. – 1983. – Т. 5, № 2. – С. 120-137.

27. Барболина И.И. Использование триптофана органических удобрений для биосинтеза индолил-3-уксусной кислоты почвенными микроорганизмами/ И.И. Барболина, Л.В. Кравченко, И.А. Архипченко // Сельскохозяйственная биология. – 1999. – №3. – С.87-90.)

28. Бачерикова А.К. Влияние состава коагулянтов на очистку сточных вод масложировых предприятий / А.К. Бачерикова, Т.В. Тарасова // Изв. вузов. Химия и химическая технология. – 1999. – Т. 42, № 6. – С. 80-83.

29. Баширов Р.Р. Влияние возраста ила на закономерности процесса аэробной стабилизации промышленных илов / Р.Р. Баширов, Р.К. Закиров, Ф.Ю. Ахмадуллина // Химическая промышленность. – 2003. – Т.80, №7. – С.3-7.

30. Белки. Химия белковых веществ / под ред.Г. Нейрата. К. Бейли; пер с англ. З.З. Высоцкого под ред. д-ра хим. наук М.М. Ботвиник. – Москва : Издательство иностранной литературы, 1956.– Т.1. – 395 с.

31. Броунштейн Б.И. Гидродинамика, массо- и теплообмен в дисперсных системах / Б.И. Броунштейн, Г.А. Фимбейн. – Ленинград: Химия, 1997. – 280 с.

32. Брындина Л.В. Очистка протеолитического комплекса *Str. chromogenes* s.g. 0832 / Л.В. Брындина, Н.А. Жеребцов // Технология ключевых соединений, используемых в синтезе биологически активных веществ: тезисы докладов Всесоюзной научной конференции. – Пенза,1991. – С.74-75.

33. Брындина Л.В. Выделение ферментов методом сублимации / Л.В. Брындина, С.В. Николаенко // Технология ключевых соединений,

используемых в синтезе биологически активных веществ: тезисы докладов Всесоюзной научной конференции. – Пенза, 1991. – С.75-76.

34. Брындина Л.В. Ферментативный гидролиз фибриллярных белков / Л.В. Брындина // Биологически активные соединения, синтез и использование: тезисы докладов Всесоюзной научной конференции. – Пенза, 1992. – С.70-72.

35. Брындина Л.В. Переработка кератинсодержащего сырья методом ферментации / Л.В. Брындина, В.В. Варваров // Вестник Российской академии сельскохозяйственных наук. – 1996. – №1. – С.79-80.

36. Брындина Л.В. Обезвоживание производственных сточных вод предприятий молочной промышленности на основе биологических методов обработки / Л.В. Брындина, С.Б. Зуева, М.Г. Иванова // Экология ЦЧО РФ: научно-практический журнал по проблемам экологии, охраны окружающей среды и рационального природопользования. – 1999. – №2. – С.103-104.

37. Брындина Л.В. Возможные пути снижения загрязнения сточных вод / Л.В. Брындина // Экологические и правовые аспекты эксплуатации водохранилищ: материалы первой международной научно-практической конференции. – Воронеж, 2003. – С.195-199.

38. Брындина Л.В. Проблемы экологической безопасности / Л.В. Брындина // Экологические и правовые аспекты эксплуатации водохранилищ: материалы первой международной научно-практической конференции. – Воронеж, 2003. – С.272-282.

39. Брындина Л.В. Комплексная очистка сточных вод биофлокулянтами / Л.В. Брындина, О.С. Корнеева, В.Ф. Асминин // Биотехнология и современность: международный форум. С.-Пб., 2-3 июня 2004. – С.-Пб., 2004. – С.46-47.

40. Брындина Л.В. Применение биофлокулянтов в очистке сточных вод / Л.В. Брындина, О.С. Корнеева, С.Н. Перов // Биотехнология: состояние и перспективы развития: материалы III Международного конгресса. – Москва, 2005. – С.59.

41. Брындина Л.В. Очистка сточных вод мясокомбинатов биосорбционным способом / Л.В. Брындина, О.С. Корнеева, С.Н. Перов // Мясная индустрия. – 2005. – №9. – С.36-38.
42. Брындина Л.В. Современные методы очистки сточных вод / Л.В. Брындина // Совершенствование техники, технологии и методов управления на предприятиях пищевой и перерабатывающей промышленности: материалы VI научно-практической конференции. – Воронеж, 2006. – С.169-179.
43. Брындина Л.В. Очистка сточных вод биофлокулянтom на основе актиномицета *Streptomyces chromogenes* / Л.В. Брындина, С.Н. Перов, И.В. Попова // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2006. – Т.6. – Вып.4. – С.648-652.
44. Брындина Л.В. Интенсификация процесса очистки сточных вод мясоперерабатывающих производств / Л.В. Брындина, О.С. Корнеева, С.Н. Перов // Биотехнология. – 2006. – №5. – С.67-69.
45. Брындина Л.В. Оценка предприятий мясной промышленности с экологических позиций / Л.В. Брындина // Экологические системы и приборы. – 2007. – №12. – С.27-29.
46. Брындина Л.В. Влияние физико-химических факторов на флокулирующие свойства актиномицета *Str. chromogenes s.g. 0832* / Л.В. Брындина // Экология и безопасность жизнедеятельности промышленно-транспортных комплексов: первый международный экологический конгресс. – Тольятти, 2007. – С.277-281.
47. Брындина Л.В. Флокуляционное взаимодействие микроорганизмов и частиц сточной воды / Л.В. Брындина // Современные проблемы экологии и безопасности: всероссийская научно-техническая конференция. – Тула, 2007. – С. 62-64.
48. Брындина Л.В. Очистка сточных вод биофлокулянтами / Л.В. Брындина, В.Ф. Асминин, С.Н. Перов // Экология и безопасность

жизнедеятельности промышленно-транспортных комплексов: II Международный экологический конгресс. – Тольятти, 2009. – С.140-144.

49. Брындина Л.В. Оценка уровня экологичности производств по степени использования водных ресурсов / Л.В. Брындина, В.Ф. Асминин // Совершенствование техники, технологии и методов управления на предприятиях пищевой и перерабатывающей промышленности: материалы IX научно-практической конференции. – Воронеж, 2009. – С.82-86.

50. Брындина Л.В. Влияние УЗ на протеолитическую активность биофлокулянта *Str. chromogenes* s.g. 0832 / Л.В. Брындина, В.Ф. Асминин // Экология и промышленность России. – 2010. – №12. – С.18-19.

51. Брындина Л.В. Сорбционные свойства *Str. chromogenes* s.g. 0832 / Л.В. Брындина // Экология и промышленность России. – 2011. – № 11. – С.14-15.

52. Брындина Л.В. Очистка сточных вод от ионов железа клетками *Streptomyces chromogenes* s.g. 0832 / Л.В. Брындина // Безопасность жизнедеятельности. – 2011. – №12. – С.15-17.

53. Брындина Л.В. Математическое обоснование условий биосорбционной очистки белковосодержащих отработанных технологических вод / Л.В. Брындина, К.К. Полянский // Вестник Тамбовского университета. Сер. Естественные и технические науки. – 2013. – Т.18. – Вып.4. – С.1466-1470.

54. Брындина Л.В. Сорбционные возможности биофлокулянта *Streptomyces chromogenes* s.g. 0832 и его специфические свойства. / Л.В. Брындина, К.К. Полянский // Вестник Тамбовского университета. Сер. Естественные и технические науки. – 2013. – Т.18. – Вып.4. – С.1463-1465.

55. Брындина Л.В. Изучение способности актиномицетов к биodeградации трудноразлагаемых белков в сточных водах мясокомбинатов / Л.В. Брындина, О.С. Корнеева, Полянский К.К. // Вестник Тамбовского университета. Сер. Естественные и технические науки. – 2015. – Т.18. – Вып.4. – С.1463-1465.

56. Бузов И.П. Определение протеолитической активности молокосвертывающих протеаз / И.П. Бузов // Рукопись ВНИИМС. - 1973. -5с.
57. Варваров В.В. Исследование температурных режимов очистки сточных вод молочных заводов / В.В. Варваров, Л.В. Брындина, Е.Б. Ширнина // Прогрессивные технологии и оборудование для пищевой промышленности: международная научно-техническая конференция. – Воронеж, 1997. – С.327-328.
58. Варваров В.В. Особенности биологической очистки сточных вод молочной промышленности / В.В. Варваров, Л.В. Брындина, Е.Б. Ширнина // Экология и безопасность жизнедеятельности: межвузовский сборник научных трудов. – Воронеж, 1997. – Выпуск 2. – С.162-164.
59. Варваров В. В. Влияние соотношения сточная вода-микроорганизм на степень очистки / В.В. Варваров, Л.В. Брындина, Е.Б. Ширнина // Безопасность жизнедеятельности в Сибири и на Крайнем Севере: 2-я международная научно-практическая конференция. – Тюмень, 1997. – С.105-106.
60. Варфоломеев С.Д. Биоинформатика и молекулярное моделирование в химической энзимологии. Активные центры гидролаз / С.Д. Варфоломеев, И.В. Упоров, Е.В. Федоров // Биохимия. – 2002. – № 10. – С. 1328 - 1340.
61. Варфоломеев С.Д. Активные центры ферментов: биоинформатика, архитектура, механизмы действия: обзор / С.Д. Варфоломеев, К.Г. Гуревич // Изв. Рос. акад. наук. Серия химическая. – 2001. – № 10. – С. 1629-1637.
62. Василевская И.А. Актиномицеты – продуценты биологически активных веществ / И.А. Василевская. – Киев: Высшая школа, 1979. – 43 с.
63. Величко Б.А. Био – и фитосорбенты для очистки питьевой воды и промышленных стоков / Б.А. Величко, Н.У. Венсковский, Э.А. Рудак // Экология и промышленность России. – 1998. – №1. – С. 28-32.
64. Величко Б.А. Результаты и перспективы применения биосорбентов при решении некоторых экологических проблем / Б.А. Величко, Г.А. Абрамов, А.А. Шутова // Экология и пром. пр-ва. – 1998. – №12. – С. 42-47.

65. Вейцер Ю.И. Высокомолекулярные флокулянты в процессах очистки природных и сточных вод / Ю.И. Вейцер, Д.М. Минц. – Москва: Стройиздат, 1984. – 200 с.
66. Винцюнайте, М.М. Влияние солевого состава питательной среды на биосинтез протеолитических ферментов глубинной культурой *Actinomyces fradiae* / М.М. Винцюнайте // Прикладная биохимия и микробиология. – 1969. – Т.5, №3. – С.273-277.
67. Винцюнайте М.М. Влияние источников органического азота на биосинтез протеиназ глубинной культурой *Actinomyces fradiae* 119 / М.М. Винцюнайте, И.С. Петрова // Прикладная биохимия и микробиология. – 1969. – Т.5, №14. – С. 421-426.
68. Воробьев Н.Е. Борьба с сорняками при возделывании сельскохозяйственных культур / Н.Е. Воробьев, Б.М. Силыбаева, Е.М. Шабанова. – Москва, 1988. – 206с.
69. Временная типовая методика определения экономической эффективности осуществления природоохранных мероприятий и оценки экономического ущерба, причиняемого народному хозяйству загрязнением окружающей среды. – Москва, 1983. – 87с.
70. Гаузе Г.Ф. Определитель актиномицетов. Роды *Streptomyces*, *Streptoverticillium*, *Chainia*. / Г.Ф. Гаузе, Т.П. Преображенская. – Москва: Наука, 1983. – 248с.
71. Гвоздяк, П.И. Очистки фенолсодержащих сточных вод закрепленными микроорганизмами / П.И. Гвоздяк, Н.Ф. Могилевич, Н.И. Куликов // Химия и технология воды. – 1989. – Т. 11, №1. – С. 73-75.
72. Гвоздяк П.И. Очистка промышленных сточных вод прикрепленными микроорганизмами / П.И. Гвоздяк, Г.Н. Дмитриенко, Н.И. Куликов // Химия и технология воды. – 1985. – Т.7, №1. – С. 64-68.
73. Глоба Л.И. Влияние физико-химических свойств микроорганизмов на эффективность их удаления из воды / Л.И. Глоба // Химия и технология воды. – 1985. – Т. 7, №1. – С. 73-78.

74. Глоба Л.И. Очистка природной воды от фенола иммобилизованным пресноводным биоценозом/ Л.И. Глоба, П.И. Гвоздяк, Н.Б. Загорная // Химия и технология воды. – 1996. – Т. 18, № 2. – С. 195-198.
75. Гоголашвили Э.Л. Влияние органических полимерных коагулянтов на эффективность процесса водоочистки / Э.Л. Гоголашвили, В.Ф. Куренков, И.Е. Молгачева, А.И. Гайсина // Структура и динамика молекулярных систем. – 2003. – Вып. X., ч.2. – С. 85-88.
76. Гончаров В.И. Интенсификация процессов биохимической очистки сточных вод / В.И. Гончаров, В.Н. Смолин // Сборник научных трудов Международной научно-практической конф. – Смоленск, 1999. – 270с.
77. ГОСТ 20264.2 – 88. Методы определения протеолитической активности. Взамен ГОСТ 20264.1-74; введен с 01.07.88. – Москва: Изд-во стандартов, 1984. – 11 с.
78. Государственный доклад «О состоянии и об охране окружающей среды РФ в 2014г.» Подготовлен МПР и Экологии РФ совместно с заинтересованными министерствами, федеральными службами, федеральными агентствами, другими организациями и учреждениями. – Москва, ООО «РППР РусКонсалдингГрупп» по заказу МПР и Экологии РФ, 2015. – 488с.
79. Грачева И.М. Технология ферментных препаратов / И.М. Грачева. – Москва: Пищевая пром-ть, 1975. – 392с.
80. Гридэл Т.Е. Промышленная экология: учеб.пособие для вузов / Т.Е. Гридэл, Б.Р. Алпенби; пер с англ. под ред. проф. Э.В. Гирусова. – Москва: ЮНИТИ – ДАНА, 2004. – 527с.
81. Губанов Л.Н. Решение экономических задач обработки осадков городских сточных вод / Л.Н. Губанов, В.А. Филин, Ф.Н. Хакимов // Вода и экология. Проблемы и решение. – 2001. – №3. – С. 36-41.
82. Гусев М.В. Микробиология: учебник/ М.В. Гусев, Л.А. Минеева. – Москва: Изд-во Моск.ун-т, 1985. – 376с.

83. Девятова Т.А. Измерение ферментативной активности почв в черноземе выщелоченном при пирогенном воздействии / Т.А. Девятова, Ю.С. Горбунова // Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2012. – №2. – С. 136-143.
84. Дегтярева Е.А. Почвенные актиномицеты как потенциальные бифунгициды / Е.А. Дегтярева, К.А. Виноградова, А.В. Александрова, В.А. Филоненко, П.А. Кожевин // Вести Моск. ун-та. Сер. 17. Почвоведение. – 2009. – № 2. – С. 22 - 28.
85. Диксон М.С. Ферменты: соч. в 3т. / М.С. Диксон, Э.С. Уэбб; пер. с англ. Л.М. Гиномдана, М.И. Левянт; под ред. В.К. Антонова, А.Е. Браунштейна. – Москва: Мир, 1982. – Т.1. – 118с.
86. Долидзе Д.А. Оптимизация состава среды для биосинтеза протеолитических ферментов *Actinomyces fradiae* 110 с помощью математических методов планирования эксперимента / Д.А. Долидзе, Ц.С. Турманидзе, И.С. Петрова // Известия АН ГССР. Серия биологическая. – 1975. – Т.1, №5. – С. 437-441.
87. Долидзе Д.А. Отбор продуцентов протеолитических ферментов у актиномицетов / Д.А. Долидзе, Д.Т. Патария, Ц.С. Турманидзе, Г.И. Квеситадзе // Микробиология. – 1983. – Т.52, №1. – С. 62-83.
88. Доскина Э.П. Проектирование очистных сооружений водоотводящих систем: биологическая очистка / Э.П. Доскина, Т.Д. Кичева. – Волгоград: ВолгГАСА, 2002. – 54с.
89. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта / Б.А. Доспехов. – Москва:Агропром издат, 1985. – 351с.
90. Дубяга В.П. Полимерные мембраны / В.П. Дубяга, Л.П. Перепечкин, Е.Е. Каталевский. – Москва: Химия, 1981. – 232с.
91. Европейская рамочная водная директива WFD 2000/60/ЕС.
–[Электронный ресурс]. – Режим
доступа:<http://www.pandia.ru/text/77/295/81882.php>.

92. Ельцев С.В. Физическая и коллоидная химия: учеб. пособие / С.В. Ельцев, Н.А. Водолазская. – Харьков, 2005. – 240с.
93. Ельцева Т.А. Щелочные протеазы микробиологического происхождения / Т.А. Ельцева, С.А. Коновалов // Прикладная биохимия и микробиология. – 1978. – Т.14, № 5. – С. 661-670.
94. Ефремов В.В. Трансформация форм кальция и фосфора в типичном черноземе при внесении извести и минеральных удобрений / В.В. Ефремов, Р.А. Ширшова, И.А. Пивоварова, А. В. Кузовлев // Физико-химические аспекты почвенного плодородия. – Москва, 1985. – С. 42-51.
95. Жеребцов Н.А. Амилолитические ферменты в пищевой промышленности / Н.А. Жеребцов. – Москва: Легкая и пищевая пром-ть, 1984. – 160с.
96. Жеребцов Н.А. Влияние источников углеродного и азотного питания на биосинтез протеиназ с кератинрасщепляющим действием/ Н.А. Жеребцов, Л.В. Насонова // Прикладная биохимия и микробиология. – 1989. – Т. 25, №4. – С.508-512.
97. Житин Ю.И. Проблемы использования отходов производства в агроэкосистемах Центрального Черноземья: монография/ Ю.И.Житин, Н.В. Стекольников. – Воронеж: ФГБОУ ВО Воронежский ГАУ, 2015. – 218с.
98. Завальский Л.Ю. Движение бактерий в пористых средах / Л.Ю. Завальский, А.Г. Волошин // Микробиология. – 2003. – Т.72, № 3. – С.414 - 418.
99. Закиров Н.З. *Torula thermophila* шт. У₃ ПТ-I – термофильный продуцент протеолитических ферментов / Н.З. Закиров, С.С. Щелокова, Н.Н. Караваева // Прикладная биохимия и микробиология. – 1975. – Т. II, № 5. – С. 686-690.
100. Запольский А.К. Коагулянты и флокулянты в процессах очистки воды. Свойства. Получение. Применение / А.К. Запольский, А.А. Баран. – Ленинград: Химия, 1987. – 208с.

101. Захаров Н.Г. Эффективность использования осадков сточных вод в качестве удобрения сельскохозяйственных культур в зернопропашном севообороте: дис.... канд. с/х. наук: 06.01.01., 03.00.16: защищена 27.02.04/ Захаров Николай Григорьевич. – Ульяновск, 2004. – 194с.
102. Звягинцев Д.Г. Взаимодействие микроорганизмов с твердыми поверхностями / Д.Г. Звягинцев. – Москва: МГУ, 1973. – 176с.
103. Землянухин А.А. Малый практикум по биохимии / А.А. Землянухин. – Воронеж: Изд-во ВГУ, 1985. – 128с.
104. Зенова Г.М. Разнообразие актиномицетов в наземных экосистемах / Г.М. Зенова, Д.Г. Звягинцева. – Москва: МГУ, 2002. – 132с.
105. Иванов В.К. Получение новых видов биофлокулянтов / В.К. Иванов, Н.Т. Силантьева // Химия и безопасность. – 2005. – № 1. – С.5-9.
106. Измайлова В.Н. Поверхностные явления в жидкостях и жидких растворах / Н.Т. Силантьева. – Ленинград: Изд. ЛГУ, 1972. – Вып.1. – С.41-59.
107. Измайлова В.Н. Структурообразование в белковых системах / В.Н. Измайлова, П.А. Ребиндер. – Москва, 1974. – 147с.
108. Измеров Н.Ф. Эпидемиологические исследования в медицине труда и промышленной экологии / Н.Ф. Измеров, Ю.Г. Широков, Н.В. Лебедева // Медицина труда и промышленная экология. – 1994. – № 12. – С.1-5.
109. Иманбеков,С.Т. Биотермическая обработка осадков сточных вод / С.Т. Иманбеков, А.С. Хромов // Сборник научных трудов «Кыргыз-НИИП-строительства». – Бишкек: Илим, 1999. – С. 219-228.
110. Использование мембранной технологии в отраслях пищевой промышленности (обзорная информация) – Москва: Центр научно-технической информации, пропаганды и рекламы. – 1989. – 28с.
111. Калакуцкий Л.В. Лучистые грибки и родственные им организмы /Л.В. Калакуцкий // Микробиология. – 2004. – Т. 73, № 5. – С.613 – 621.

112. Калюжный С.В. Биотехнология защиты окружающей среды: единство биокаталитических и инженерных подходов / С.В. Калюжный // Известия Академии наук. Серия химическая. – 2001. – №10. – С. 1735-1742.
113. Кашкин А.П. Препараты протеолитических ферментов *Actinomyces fradiae* 0072 / А.П. Кашкин, Ю.М. Воеводин, Г.Е. Гринберг // Прикладная биохимия и микробиология. – 1974. – Т. 10, № 4. – С. 515-520.
114. Кашкин А.П. Характеристика внеклеточных протеолитических ферментов *Actinomyces fradiae* 0072 / А.П. Кашкин, Ю.М. Воеводин, Т.Г. Маклова // Прикладная биохимия и микробиология. – 1976. – Т. 12, № 4. – С. 563-571.
115. Ковалев В.В. Деструкционная очистка концентрированных сточных вод от труднодеградируемых органических веществ / В.В. Ковалев, Г.Г. Дука, О.В. Ковалев // Международный конгресс по отходам. – Москва, 1997. – С. 412-413.
116. Ковалев Н.Г. Биоконверсия отходов животноводства / Н.Г. Ковалев // Вестн. Рос. Акад. с-х наук. – 2003. – № 2. – С. 28 -30.
117. Коваленко Г.А. Углеродсодержащие микроструктурированные керамические носители для адсорбционной иммобилизации ферментов и микроорганизмов/ Г.А. Коваленко, О.В. Комова, А.В. Симаков, Н.А. Рудина, В.В. Хомов // Биотехнология. – 2002. – № 3. – С.55 – 56.
118. Кольцова О.М. Агроэкологическое состояние чернозема выщелоченного типичной лесостепи / О.М. Кольцова // Экологические проблемы сельскохозяйственного производства: материалы международной научно-практической конференции. Воронеж: ВГАУ, 2004. – С.59-60.
119. Комаров В.И. Количественная оценка технологических процессов по степени мало- и безотходности / В.И. Комаров, Т.А. Мануйлова // Пищевая промышленность. – 1995. – №3. – С. 2-3.
120. Комаров В.И. Проблемы использования вторичных сырьевых ресурсов отраслей пищевой и перерабатывающей промышленности и их влияние на

- окружающую среду / В.И. Комаров, Е.И. Лебедев, Т.А. Мануйлова // Хранение и переработка сельхозсырья. – 1998. – № 3. – С. 6-10.
121. Корнеева О.С. Совместное использование микроорганизмов в биологической очистке сточных вод / О.С. Корнеева, С.Н. Перов, Л.В. Брындина // Экологические системы и приборы. – 2006. – №11. – С. 13-15.
122. Копейкина Н.Г. Методика оценки уровня экологичности применяемых технологий / Н.Г. Копейкина // Роль природоустройства в обеспечении устойчивого функционирования и развития экосистем: материалы международной научно-практической конференции. – Москва, 2006. – С. 1 - 6.
123. Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии: учеб. пособие для студентов биологических специальностей университетов / Г.А. Кочетов. – Москва: Высшая школа, 1980. – 272с.
124. Кошкина Л.Ю. Биосорбционная очистка ПАВ-содержащих сточных вод с микробной регенерацией адсорбента / Л.Ю. Кошкина, А.С. Сироткин // Химическая промышленность. – 2001. – № 9. – С. 40-42.
125. Крестьянова И.Н. Изоэлектрическое фокусирование препарата протеолитических ферментов из *Streptomyces* 771 / И.Н. Крестьянова, Л.И. Васильева, Ю.Э. Бартошевич // Приклад. биохимия и микробиология. – 1983. – Т.19, № 2. – С. 217-225.
126. Кретович В.Л. Техническая биохимия: учеб. пособие / В.Л. Кретович, Л.В. Метлицкий, М.А. Бокучава, Н.И. Скобелева, З.Н. Кишковский, Г.С. Ильин, Р.Ф. Фениксова. – Москва: Высшая школа, 1973. – 456с.
127. Крисс А.Е. Исследование строения актиномицетов с помощью электронного микроскопа / А.Е.Крисс, Е.А. Рукина, Б.Н. Исаев // Микробиология. – 1945. – Т.14, вып.3. – С. 172 - 176.
128. Ксенофонтов Б.С. Очистка производственных вод в приборостроении / Б.С. Ксенофонтов, И.В. Кулешов. – Москва: Моск. институт повышения квалификации Минприбора, 1985. – 55с.

129. Ксенофонов Б.С. Моделирование процесса электрофлотационной очистки сточных вод / Б.С. Ксенофонов // Экспресс – информация. Сер. «Промышленность горнохимического сырья» НИИТЭХИМ. – 1987. – №4. – С. 1-8.
130. Ксенофонов Б.С. Сгущение суспензии активного ила центрифугированием / Б.С. Ксенофонов, Б.Л. Чаморцев, Б.А. Кривой // Биотехнология. – 1988. – Т. 4, №6. – С.770-774.
131. Ксенофонов, Б.С. Очистка сточных вод: флотация и сгущение осадков / Б.С. Ксенофонов. – Москва: Химия, 1992. – 144с.
132. Ксенофонов Б.С. Очистка почвы, грунтов и осадков сточных вод методом флотации / Б.С. Ксенофонов, Л.А. Дулина, Н.Г. Глазова // Экология промышленного производства. – 2003. – № 3. – С. 4 - 7.
133. Ксенофонов Б.С. Использование флотационной техники в оборотных системах водоснабжения / Б.С. Ксенофонов // Экология производства. – 2006. – № 10. – С.3 - 8.
134. Ксенофонов Б.С. Интенсификация флотационной очистки сточных вод и насыщения их кислородом / Б.С. Ксенофонов, А.С. Козодаев, С.Н. Капитонова, Д.В. Дьяченко, С.Д. Морозов, Л.Д. Дулина // Безопасность жизнедеятельности. – 2006. – № 1. – С. 36 - 38.
135. Ксенофонов Б.С. Очистка поверхностных сточных вод автозаправочных станций и автомоек / Б.С. Ксенофонов, А.С. Козодаев, С.И. Черных // Безопасность в техносфере. – 2007. – № 5. – 46с.
136. Ксенофонов Б.С. Очистка грунтов от нефтепродуктов флотацией / Б.С. Ксенофонов, А.С. Иванов, А.С. Козодаев, Р.А. Таранов, В. Асатурян // Безопасность жизнедеятельности. – 2008. – № 8. – С. 27 - 28.
137. Ксенофонов Б.С. О воздействии слабых электромагнитных поле на водные системы и разработка магнито- и электросмесителей / Б.С. Ксенофонов // Безопасность жизнедеятельности. – 2008. – № 12. – С. 28 - 31.

138. Ксенофонов Б.С. Совершенствование технологии очистки вод биохимических производств / Б.С. Ксенофонов // Безопасность жизнедеятельности. – 2009. – № 1. – С. 40 - 42.
139. Ксенофонов Б.С. Технология очистки промышленных сточных вод энергопредприятий / Б.С. Ксенофонов // Безопасность жизнедеятельности. – 2009. – № 7. – С.1 -12.
140. Ксенофонов Б.С. Интенсификация очистки сточных вод химических производств с использованием биофлокулянтов / Б.С. Ксенофонов // Безопасность жизнедеятельности. – 2009. – № 10. – С.18 -20.
141. Ксенофонов Б.С. Биотехнологические методы очистки воды, почвы и воздуха / Б.С. Ксенофонов // Безопасность жизнедеятельности. – 2010. – № 2. – С.1 - 24.
142. Куренков В.Ф. Применение полиакриламидных флокулянтов для водоочистки / Hans – Georg Hartan, Ф.И. Лабанов // Химия и компьютерное моделирование. Бутлеровские сообщения. – 2002. – №11. – С. 31-40.
143. Куренков В.Ф. Флокулирующие свойства полимеров / В.Ф. Куренков, С.В. Снигирев. - Казань: Казан. гос. технол. ун-т, 2001. – 32с.
144. Кучаева А.Г. Кератиная активность актиномицетов группы «*Fradiæ*» / А.Г. Кучаева, С.Д. Таптыкова, Р.Л. Гешева, Н.А. Красильников // Доклады АН СССР. – 1963. – Т. 148, №6. – С. 1400-1402.
145. Липатов Ю.С. Коллоидная химия полимеров / Ю.С. Липатов. – Киев: Наукова думка, 1984. – 343с.
146. Лурье Ю.Ю. Аналитическая химия промышленных сточных вод / Ю.Ю. Лурье. – Москва: Химия, 1984. – 448с.
147. Лурье Ю.Ю. Химический анализ производственных сточных вод / Ю.Ю. Лурье, А.И. Рыбников. – Москва: Химия, 1976. – С. 45-54.
148. Майстренко В.Н. Эколого-аналитический мониторинг суперэкоотоксикантов / В.Н. Майстренко, Р.З. Хамитов, Г.К. Будников. – Москва: Химия, 1996. – 320с.

149. Мак-Бэн, Дж. В. Сорбция газов и паров твердыми телами: пер. с англ / Дж. В. Мак-Бэн. – М.-Л.: ОНТИ-Гос. хим.-техн. изд-во, 1934. – 397 с.
150. Максимов В.И. Повышение стабильности ферментов при их выделении, очистке, хранении и использовании / В.И. Максимов. – Москва, 1973. – 84с.
151. Малахов И.А. Очистка сточных вод мясоперерабатывающих предприятий / И.А. Малахов // Мясная индустрия. – 2001. – №7. – С. 49-51.
152. Матов, Б.М. Электрофлотация. Новое в очистке сточных вод / Б.М. Матов. – Кишинев: Картя Молдавэняске, 1971. – 256с.
153. Медведев, Г.П. Канализация городов ФРГ / Г.П. Медведев. – Ленинград: Стройиздат, 1982. – 168с.
154. Медведев Г.П. Подготовка к обезвоживанию и центрифугование осадков сточных вод / Г.П. Медведев. – Ленинград: ЛИСИ, 1983. – С. 11-12.
155. Милащенко Н.З. Устойчивое развитие агроландшафтов / Н.З. Милащенко, О.А. Соколов, Т. Брайсон, В.А. Черников // Экологическая безопасность и устойчивое развитие. В 2-х т-х. Т.2. – Пущино: ОНТИПНЦ РАН, 2000. – 282с.
156. Мусабеков К.Б. Электрокинетический потенциал кварца в водных растворах высокомолекулярных ПАВ / К.Б. Мусабеков, К.И. Осарова, А.И. Изимов // Коллоидн.журнал. – 1981. – Т.43, №3. – С. 577-579.
157. Мясников С.К. Интенсификация реагентного умягчения воды с использованием гетерогенной кристаллизации и ультразвукового воздействия / С.К. Мясников, А.П. Чипрякова, Н.Н. Кулов // Вода: химия и экология. – 2010. - № 2. – С. 11 - 17.
158. Нагаев В.В. Исследование биосорбционной очистки сточных вод в опытно-промышленном эксперименте/ В.В. Нагаев, А.С. Сироткин, М.В. Шулаев. – Казань. Казан. гос. технол. ун-т, 1996. – 13с.
159. Надысев В.С. Очистка сточных вод предприятий масложировой промышленности / В.С. Надысев. – Москва: Пищевая промышленность. – 1986. – 183с.

160. Назарян М.Н. Очистка жиросодержащих стоков в колонных коагуляторах / М.Н. Назарян, В.В. Березуцкий // Масложировая промышленность. – 1984. – № 8. – С. 29-31.
161. Найдено В.В. Обеззараживание биологически очищенных сточных вод / В.В. Найдено, Ю.Ф. Колесов, Л.Н. Губанов, Б.А. Минеев // Водоснабжение и сан.техника. – 1994. – №12. – С. 15-17.
162. Найдено В.В. Новое в нормативной базе для систем водоснабжения и водоотведения / В.В. Найдено, С.В. Яковлев, Т.В. Дятлова, И.Н. Чурбанова // Водоснабжение и сан.техника. – 1997. – №3. – С. 2-4
163. Неклюдов А.Д. Биологически активные соединения из природных объектов, свойства и структурно-функциональные взаимосвязи / А.Д. Неклюдов, А.Н. Иванкин. – Москва, 2003. – 480с.
164. Николаев Н.И. Диффузия в мембранах / Н.И. Николаев. - Москва: Химия, 1980. – 232 с.
165. Оборудование, сооружения, основы проектирования химико-технологических процессов защиты биосферы от промышленных выбросов: учебное пособие для вузов / А.И. Родионов [и др.]. – Москва: Химия, 1985. – 352 с.
166. Отечественный производственный опыт. Экспресс-информация. – Москва: Пищевая промышленность, 1979. – 304 с.
167. Очистка сточных вод предприятий химико-фармацевтической промышленности. Совм. изд. СССР – ЧССР / С.В. Яковлев [и др.]. – Москва: Стройиздат, 1985. – С. 77-116.
168. Павленко Н.И. Интенсификация биологической очистки сточных вод нефтеперерабатывающих заводов / Н.И. Павленко, З.Г. Бега, В.В. Изжеурова // Химия и технология воды. – 1989. – Т. 11, № 6. – С. 541-544.
169. Пазенко Т.Я. Очистка маслоэмульсионных сточных вод / Т.Я. Пазенко, Г.И. Халтурина, И.М. Мурашев // Журнал прикл. хим. – 1982. – Т. 55, № 4 – С. 935-940.

170. Пазенко Т.Я. Очистка жиросодержащих сточных вод / Т.Я. Пазенко, Г.И. Халтурина // Журнал прикл. хим. – 1982. – Т. 57, № 6 – С. 745-749.
171. Паников Н.С. Количественные закономерности потребления микроорганизмами элементов минерального питания. Рост микроорганизмов / Н.С. Паников. – Пущино, 1984. – С. 37-50.
172. Панников В.Д. Почва, климат, удобрение и урожай / В.Д. Панников, В.Г. Минеев. – Москва: Агропромиздат, 1987. – 511с.
173. Пасынский А.Г. Современные физикохимические методы исследования белков / А.Г. Пасынский // Журнал: Успехи химии. – 1941. – Т. 10, вып. 5. – С.519.
174. Пат.1341 Белоруссия С1 ВУ, МПК⁶ С О2 F 3/30, 3/34. Способ очистки сточных вод, содержащих органические соединения, преимущественно формальдегид и метанол / А.С. Самсонова, З.М. Алещенкова, Б.М. Михнюк – № 1103; заявл. 29.12.93; опубл. 16.09.96, Афіцыйны бюлетэнь Дзярж.пат.ведамства Рэсп. Беларусь № 3. – С. 150.
175. Пат.2060953 Российская Федерация, МКИ⁶ С О2 F 1/28. Способ очистки сточных вод, содержащих формальдегидные смолы / Л.И. Бельчинская, Н.И. Послухаев, Ю.И. Тарасевич, О.А. Ткачева – № 93057162/26; заявл. 23.12.93; опубл. 27.05.96, Бюл. № 15.
176. Пат. 2084404 Российская Федерация, МКИ⁶ С О2 F 1/28. Способ очистки сточных вод / Л.И. Бельчинская и др. – № 94040419/25; заявл. 31.10.94; опубл. 21.10.97, Бюл. № 20.
177. Пат.2085500 Российская Федерация, МКИ⁶ С О2 F 1/28. Способ очистки сточных вод / Л.И. Бельчинская и др. – № 94040420/25; заявл. 31.10.94; опубл. 27.07.97, Бюл. № 21.
178. Пат. 6146531 США, МПК⁷ С 02 F 3/06. Метод и аппарат для биологической очистки воды / Matheson Mark A. – № 09/ 244297; заявл. 03. 02. 99; опубл. 14. 11. 00; НПК 210 /606.
179. Пат. 2201911 Российская Федерация, МКИ⁶ С О5 F 11/08, 9/00. Способ утилизации твердых бытовых отходов и получение органического удобрения

- / Д.И. Стом, С.В. Солдатов, Т.Ф. Казаринова и др. – № 20001321/75; заявл. 21.12.2000; опубл. 10.04.2003, Бюл. № 10.
180. Пат. 3418 Белоруссия ВУ, МПК⁶ В 09С 1/10, 101:00, С 09К 3/32. Способ очистки почвы от нефти / А.С. Самсонова, З.М. Алещенкова, А.Э. Томсон и др. – № 970052; заявл. 06.02.97; опубл. 30.06.2000, Афіцыйны бюлетэнь Дзярж.пат.ведамства Рэсп. Беларусь. - № 2. – С. 87.
181. Пат. 2312073 Российская Федерация, МПК⁷ С02F003/34, С12N001/20, С12R001/465. Способ биосорбционной очистки сточных вод от ионов тяжелых металлов / Корнеева О.С., Перов С.Н., Брындина Л.В., Попова И.В. ; заявитель и патентообладатель Воронеж. Гос. Ун-т инженерных технологий. – № 2006110825/13; заявл.04.03.06; опубл.10.12.2007, Бюл. № 34.
182. Пахненко Е.П. Осадки сточных вод и другие нетрадиционные органические удобрения: учеб. пособие / Е.П. Пахненко. – Москва: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. – 311с.
183. Первушин Ю.В. Анализ работы сооружений биологической очистки с сообществами прикрепленных микроорганизмов / Ю.В. Первушин, Н.И. Куликов // Биотехнология. – 1990. – № 4. – С. 64-68.
184. Перов С.Н. Эколого-биохимические аспекты использования актиномицетов для очистки сточных вод: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.16., 03.00.04: защищена 15.05.07./ С.Н. Перов. – Воронеж, 2007.– 147с.
185. Петрова И.С. Протеолитические ферменты актиномицетов / И.С. Петрова. – Москва: Наука, 1976. – 60 с.
186. Полторак, О.М. Физико-химические основы ферментативного катализа / О.М. Полторак, Е.С. Чухрай. – М.: Высшая школа, 1971. – 128с.
187. Полянский К.К. Нетрадиционная очистка смывных вод с технологического оборудования в молочной промышленности / К.К. Полянский, Л.В. Брындина // Хранение и переработка сельхозсырья. – 1999. – №2. – С.12-13.

188. Прокофьева-Бельговская А.А. Строение и развитие актиномицетов / А.А. Прокофьева- Бельговская А.А. – Москва: Изд-во АН СССР, 1963. – 214с.
189. Протасов В.Ф. Экология, здоровье и охрана окружающей среды в России: учебное и справочное пособие / В.Ф. Протасов. – Москва: Финансы и статистика, 2001. – 672 с.
190. Пупырев Е.И. Вопросы водоотведения в Государственной программе «Чистая вода» / Е.И. Пупырев // Водоснабжение и санитарная техника. – 2008. – № 12. – С.6-11.
191. Путнам Ф.В. Белки / Ф.В. Путман. – Москва, 1956. – Т. 2. – С. 301-316.
192. Пчелин В.А. Поверхностные свойства белковых веществ / В.А. Пчелин. – Москва: Гизлегпром, 1951. – 146с.
193. Риц В.А. Методы обработки и утилизации осадков сточных вод предприятий гидролизной промышленности: обзорная информация. Серия II. Гидролиз растительного сырья. Вып. 3 / В.А. Риц, А.Н. Ильин. – Москва, 1983. – 40с.
194. Ротмистров М.Н., Микробиология очистки воды / М.Н. Ротмистров, П.И. Гвоздяк, С.С. Ставская. – Киев: Наукова думка, 1978. – 268 с.
195. Саванина Я.В. Взаимодействие клеток микроорганизмов с ионами золота / Я.В. Саванина, А.Ф. Лебедева, Е.Л. Барский, М.В. Гусев // Вестник Московского университета. Сер. 16, Биология. – 2006. – № 1. – С. 31 - 42.
196. Самонин В.В. Изучение закономерностей адсорбции бактериальных клеток на простых носителях / В.В. Самонин, Е.Е. Еликова // Микробиология. – 2004. – Т. 73, № 6. – С. 810 -816.
197. Самсонова А.С. Микробный препарат «Родобел» для очистки почв от нефти / А.С. Самсонова, З.М. Алещенкова, Н.Ф. Семочкина // Биотехнология - состояние и перспективы развития: материалы II Международного Конгресса. – Москва, 2003. – Ч.2 – С. 40-41.
198. Санитарные правила и нормы СанПиН 2.1.7.573 – 96. Гигиенические требования к использованию сточных вод и их осадков для орошения и

удобрения / В 9803148: утв. Госкомсанэпиднадзором РФ 31.10.98: ввод в действие с 01.11.98. – Москва: Изд-во стандартов. – 1998. – 158 с.

199. Свитцов А.А. Полупроницаемые мембраны в биотехнологии / А.А. Свитцов, Н.С. Орлов, А.Е. Кузнецов. – Москва: ВНИИСЭНТИ. Главмикробиопром, 1983. – 40 с.

200. Селеменев В.Ф. Влияние сорбции аминокислот на структуру макропористого анионита АВ-17-2П / В.Ф. Селеменев, А.Н. Зяблов, В.Н. Чиканов // Журнал физической химии. – 2002. – Т. 76, № 7. – С.1310 – 1313.

201. Серпионова Е.Н. Промышленная адсорбция / Е.Н. Серпионова. – Москва: Высшая школа, 1969. – 414 с.

202. Синев О.П. Расширение и реконструкция очистных сооружений / О.П. Синев, А.И. Мацнев, А.П. Игнатенко. – Киев: Будівельник, 1981. – 45 с.

203. Сироткина Е.Е. Применение новых адсорбентов для комплексной очистки воды / Е.Е. Сироткина, В.Г. Иванов, О.В. Глазков // Химия в интересах устойчивого развития. – 1997. – Т. 5, № 4. – С. 429-437.

204. Системы ультрафильтрации // Экспресс-информация. Зарубежный опыт. – Москва: ВНИИ СЭНТИ, 1985. – № 4. – С. 12-14.

205. Скирдов И.В. Очистка сточных вод и обработка осадков замкнутых систем водного хозяйства / И.В. Скирдов, О.В. Демидов, Д.П. Навикайте // Труды института ВОДГЕО. – 1985. – С. 41-46.

206. Степаненко Н.И. Очистка сточных вод в аэротенках / Н.И. Степаненко, А.И. Ряховская, О.А. Романенко // Химия и технология воды. – 1985. – № 2. – С. 79-80.

207. Стрельников А. Живые технологии / А. Стрельников // Химия и жизнь. – 2006. – № 2. – С. 4 - 12.

208. Тарасевич Ю.И. Адсорбция альбумина на кремнеземе / Ю.И. Тарасевич, В.А. Смирнова, Л.И. Монахова // Коллоидный журнал. – 1978. – Т.40, вып. 6. – С.1244.

209. Тевлина А.С. Водорастворимые полимеры и их применение / А.С. Тевлина //Материалы III Всесоюзной конференции.– Иркутск, 1987. – 32 с.

210. Тесленко А.А. Концентрирование суспензий микроорганизмов с помощью флокулянтов/ А.А.Тесленко, Т.Ф. Гирфанова, Ю.В. Медведев. –Москва: ВНИИСЭНТИ, 1984. – 48с.
211. Тёркина И.А. Актиномицеты рода *Streptomyces* и рода *Micromonospora* в микробном сообществе озера Байкал: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.16: защищена 03.06.04 / И.А. Теркина. – Иркутск, 2004. – 136с.
212. Теркина И.А. Антагонистическая активность актиномицетов озера Байкал / И.А. Теркина, В.В. Парфенова, Т.С. Ан // Прикладная биохимия и микробиология. – 2006. – Т.42, №2. – С.195 - 199.
213. Титова Т.С. Методология комплексной оценки влияния новых технологий на геоэкологическую обстановку / Т.С. Титова // Вестник ВНИИЖТ, 2005. – С.1-6.
214. Туровский И.С. Технология и оборудование для биотермической обработки осадков сточных вод / И.С. Туровский. – Москва: ЦБНТИ Министерство водного хозяйства, 1988. – 600с.
215. Уильямс В. Физическая химия для биологов / В. Уильямс, Х. Уильямс. – Москва: Мир, 1976. – 600с.
216. Уэбб Л. Ингибиторы ферментов и метаболизма / Л. Уэбб. – Москва: Мир, 1966. – 862с.
217. Фениксова Р.В. Протеолитические ферменты *Actinomyces fradiae* / Р.В. Фениксова, И.С. Петрова // Прикладная биохимия и микробиология. – 1965. – Т. 1, № 2. – С. 175-180.
218. Феофанов Ю.А. Влияние кислотности среды и дозы коагулянта на процесс очистки сточных вод молочных заводов оксохлоридом алюминия/ Ю.А. Феофанов, Н.Л. Литманова // Журнал прикладной химии. – 2000. – Т. 73, №8. – С. 1390-1391.
219. Филиппович Ю.Б. Практикум по общей биохимии: учеб.пособие для студентов хим.специальностей пед.ин-ов / Ю.Б. Филиппович, Т.А. Егорова, Г.А. Севостьянова; под ред. Ю.Б. Филипповича. – Москва: Просвещение, 1975. – 318с.

220. Фисин В.И. Использование птичьего помета для получения микробных удобрений с полифункциональными свойствами / В.И. Фисин, И.А. Архипченко, Э.В. Попова, И.Э. Солнцева // Доклады Россельхозакадемии. – 1999. – №2. – С.32-34.
221. Форстер К.Ф. Экологическая биотехнология / К.Ф.Форстер, Д.А. Вейз. – Ленинград: Химия, 1990. – 282с.
222. Фрашель Б. Свойства протеолитических ферментов, содержащихся в культуральной жидкости *Actinomyces ramosus* / Б. Фрашель, Э.А. Шишкова // Приклад. биохимия и микробиология. – 1998. – № 6. – С. 627-631.
223. Фридрихсберг Д.А. Курс коллоидной химии / Д.А. Фридрихсберг. – Ленинград: Химия, 1984. – 386с.
224. Хазиев Ф.Х. Системно-экологический анализ ферментативной активности почв/ Ф.Х.Хазиев. – М.: Наука, 1982. – 190с.
225. Хенце М. Очистка сточных вод / М. Хенце, П. Армоэс, Й. Ля-Кур-Янсен, Э. Арван. – Москва: Мир, 2004. – 480с.
226. Хименко Л.Л. Способы получения, строения, принцип действия синтетических флокулянтов / Л.Л. Хименко, А.Л. Каменщиков. – Пермь, 1998. – 19с.
227. Хитин и хитозан: получение, свойства и применение / К.Г. Скрыбина, Г.А. Вихорева, В.П. Варламов; под ред, К.Г. Скрыбина. – Москва: Наука, 2002. – 368с.
228. Холькин Ю.И. Флокуляционная очистка гидролизатов растительного сырья в производстве кормовых дрожжей / Ю.И. Холькин, В.В. Выглазов, В.Б. Кинд, И.Е. Стасенкова, М.Е. Сыроваткина // Гидролизная и лесохимическая промышленность. – 1988. – № 8. – С.21-23.
229. Чернобережский А.Ю. Влияние катионактивного флокулянта на осветление сточных вод бумажной фабрики / А.Ю. Чернобережский, С.С. Симонов, В.П. Семенов // Бумажная промышленность. – 1986. – № 8. – С.15 - 16.

230. Чупракова В.В. Очистка сточных вод / В.В. Чупракова, В.Н. Исаева, Л.А. Сергунина. – Москва: ОНТИ АКХ, 1971. – Вып. 105. – С. 97-114.
231. Шарифуллин В.Н. Процессы сорбции и биоокисления во флокулах активного ила / В.Н. Шарифуллин, Н.Н.Зиятдинов // Химическая промышленность. – 2001. – № 3. – С.11-13.
232. Шифрин С.М. Очистка сточных вод предприятий мясной и молочной промышленности / С.М. Шифрин. – Москва, 1981. – 272с.
233. Шкоп Я.Я. Агрегация клеток микроорганизмов в процессе разделения микробных суспензий / Я.Я. Шкоп, Н.В. Фомченко. – Москва: ИНТИТЕЙ микробиопром, 2002. – 60с.
234. Шлегель Г. Общая микробиология / Г. Шлегель. – Москва: Мир, 1987. – 567с.
235. Щербина Б.В. Очистка жидких стоков предприятий мясной и молочной промышленности / Б.В. Щербина, Е.А. Денисюк // Экспресс-информация, мясная промышленность. – Москва: ЦНИИТЭИ мясомолпром, 1981.– №7.– С.70-73.
236. Экологическая физиология микроорганизмов: учеб пособие; ч.1. Физиология микроорганизмов / Н.Ю. Филина, Н.В. Верховцева. – Ярославль, 2001. – 238с.
237. Ягодин А.Л. Химическая технология и охрана окружающей среды / А.Л. Ягодин, Л.Г. Третьякова. – Москва: Знание, 1984. – 64с.
238. Яковлев С.В. Биохимические процессы в очистке сточных вод / Л.Г. Третьякова. – Москва: Стройиздат,1980. – 200с.
239. Яковлев С.В. Рециркуляционные методы интенсификации работы биофильтров / С.В. Яковлев, Б.Н. Репин, Ш.Ч. Адхикари // Водоснабж. и санит.техн. – 1983. – № 8. – С.23-24.
240. Яковлев С.В. Биологическая очистка сточных вод: процессы, аппараты, сооружения / С.В. Яковлев, И.В. Скирдов, В.Н. Швецов. – Москва: Стройиздат, 1985. – 208с.

241. Яшин И.М. Почвенно-экологические исследования в ландшафтах /И.М. Яшин, Л.Л. Шилов, В.А. Раскатов. – Москва: МСХА, 2000. – 560с.
242. Achouak W. Purification and partial characterization of an outer membrane protein involved in the adhesion of *Rhanelia aquatilis* to wheat roots / W. Achouak, R. De Mot, T. Heulin // FEMS Microbiol. Ecol. – 2003. – V. 16. – P.19-24.
243. Akahane K. Proteins from Fowl Feather keratin / K. Akahane, S. Murozono, K. Murayama // J. Biochemical. – 1977. – Vol. 81, No 1. – P.11-18.
244. Arunakumari A. Changes in cell surface properties of *Azospirilla* in relation to cell pleomorphism and aggregation / A. Arunakumari // Symbiosis. – 2001. – V. 13. – P.291-305.
245. Asahi M. Purification and characterization of major extra cellular proteinases from *Trichophyton rubrum* / M. Asahi, R. Lindquist, R. Fukuyama, C. Apodaca, W. Epstein, J. McKerrow // J. Biochemical. – 1985. – Vol. 232, No 1. – P.139-144.
246. Aussein M. Protease and amylase activities of *Asp. flavis* grown on hydrocarbons and oxygenated hydrocarbons / M. Aussein, Magdel-Din. // Biotechnology and Bioeng. – 1998. – V. 25, No.12. – P.3197-3199.
247. Biebl H. Growth of sulfate-reducing bacteria with sulfur as electron acceptor / H. Biebl, N. Pfennig // Arch. Microbiol. – 1997. – V. 112. – P.115-117.
248. Bossier P. Triggers for microbial aggregation in activated sludge / P. Bossier, W. Verstraete // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1996. – V. 45. – P. 1-6.
249. Boswell C.D. Phosphate uptake and release by *Acinetobacter johnsonii* in continuous culture and coupling of phosphate release to heavy metal accumulation / C.D. Boswell, R.E. Dick, H.I. Eccles, L.E. Macaskie // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. – 2001. – V. 26. – P.333-340.
250. Brynda E. Adsorption of human serum albumin and fibrinogen onto a polyethilen film / E. Brynda, M. Houska, Z. Pokorna, N.A. Cepalova, Yu.V. Moisab, J. Kutnl J// J. Bioengng. – 1978. – V.2.–№2. – P.411.

251. Buswell C.M. Coaggregation amongst aquatic biofilm bacteria / C.M. Buswell, Y.M. Herlihy, P.D. Marsh // J. Appl. Microbiol. – 1997. – V. 83. – P. 477-484.
252. Carrit D.E. Comparison and evaluation of currently employed modifications of the Winkler method for determining dissolved oxygen in seawater / D.E. Carrit, J.H. Carpenter // J. Mar. Res. – 1996. – V. 24. – P. 286-313.
253. Cherry J.P. Advances in Experimental Medicine and Biology / J.P. Cherry, K.H. McWatters, J. Miller, A.Z. Sheufelt // Biopolymers. – 1977. – P. 503-530.
254. Choi S.C. Simultaneous removal of benzene, toluene and xylenes mixture by a constructed microbial consortium during biofiltration / S.C. Choi, Y.S. Oh // Biotechnol. – 2002. – V. 24. – P. 1269-1275.
255. Cong Xiao-Yan, Culture conditions for flocculant production by *Paenibacillus polymyxa* BY-28 / .Cong Xiao-Yan, Luan Zhao-Kun, Pei Yuan-Sheng, Wang Shu-Guang // J. Environ. Sci. and Health. A. – 2003. – V.38, No 4. – P. 657 - 669.
256. Cooksey D. Copper uptake and resistance in bacteria / D. Cooksey // Molecular Microbiology. – 1993. – No 7. – P. 1-5.
257. Davis B.J. Disk – Electrophoresis. Method and application to human serum proteins / B.J. Davis // Ann. N.Y. Acad. Sci. – 1964. – Vol. 121. – P. 404-427.
258. Deng S.B. Characteristics of a bioflocculant produced by *Bacillus mucilaginosus* and its use in starch wastewater treatment / S.B. Deng, R.B. Bai, X.M. Hu, Q. Luo // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2003. – V.60, No 5. – P. 588 - 593.
259. Desai J.D. Microbial production of surfactants and their commercial potential / J.D. Desai, I.M. Banat // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 1997. – V.61. – P.47-64.
260. Dhar K. Purification and characterization of *Streptomyces griseus* catechol o-methyltransferase / K. Dhar, J.P.N. Rosazza // Appl. Environ. Microbiol. – 2003. – V.66. – P. 4877-4882.

261. Dowling L.M. Structural homology between hard d-keratin and the intermediate filament proteins desmin and vimentin / L.M. Dowling, D.A. Parry, L.G. Sparrow // *Biocsi. Repts.* – 1983. – V.3, No 1. – P. 73-78.
262. Forster C.F. Aspects of the behavior of filamentous microbes in activated sludge / C.F. Forster // *J. Charter. Inst. Water and Environ. Manag.* – 1996. –No 4. – P. 290-294.
263. Fuenmayor S.L. A gene cluster encoding steps in the conversion of naphthalene to gentisate in *Pseudomonas* sp. / S.L. Fuenmayor, M. Wild, A.L. Boyles, P.A. Williams // *J. Bacteriol.* – 1998. – V. 180. – P. 2522-2530.
264. Gao J. Characterization of a bioflocculant from a newly isolated *Vagococcus* sp. W 31 / J. Gao, H.Y. Bao, M.X. Xin, Y.X. Liu, Q. Li, Y.E. Zhang // *J. Zhejiany Univ. Sci. B.* – 2006. – V. 7, No 3. – P. 186 -192.
265. Gocheva J. Characterization of Ca^{2+} - binding protein isolated from *Streptomyces Hygroscopicus* 155 / J. Gocheva, P. Moncheva, B. Gocheva, S. Danova, S. Antonova-Niolova, J. Jvanova // *Biotechnol. and Biotechnol. Equip.* – 2001. – V.15, No 2. – P. 39 - 42.
266. Gomoiu I. Properties of a kaolin-flocculating polymer elaborated by *Byssochlamys nivea* / I. Gomoiu, J. Brian, Catley // *Enzyme and Microb. Technol.* – 1996. – V. 19, No 1. – P. 45-49.
267. Gottlieb D. Bergey's manual of determinative bacteriology. 8 the Ed / D. Gottlieb, R.E. Buchanan, N.E. Gibbons // Baltimore, Williams and Wilkins Co, 1974. – 657 p.
268. Greenberg E.P. Quorum sensing by bacteria / E.P. Greenberg, S. Winans, C. Fuqua // *Ann. Rev. Microbiol.* – 1996. – V. 50. – P. 727-751.
269. Hamoda M.F. Treatment of phenolic wastes in an aerated submerged fixed-film (ASFF) bioreactor / M.F. Hamoda, A.H. Al-Haddad, M.F. Abl-El-Bary // *J. Biotechnology.* –1987. – V. 5, No 4. – P. 279-292.
270. Hogg R. Flocculation and dewatering / R. Hogg // *Int. J. Mineral Process.* – 2000. – V. 58. – P. 223-236.

271. Jchita F. Denaturation and inactivation of enzyme proteins XIX. Kinetic studies on the alkali denaturation of bacterial proteinase N' and its complex with diisopropylfluorophosphate / F. Jchita // L. Biochem. – 1963. – No 53. – P. 398-402.
272. Jensen P. Distribution of actinomycetes in near-shore tropical marine sediments / P. Jensen, R. Dwight, W. Fenical // Appl. Environ. Microbiol. 1992. – V. 54. – P. 1102-1108.
273. Jiang C. Diversity of aquatic actinomycetes in lakes of the middle plateau, Yunnan, China / C. Jiang, L. Xu // Appl. Environ. Microbiol. – 1996. – V. 62, No 1. – P. 249-253.
274. IWA-World Water Congress and Exhibition 2008. Vienna, 7-12 September. – Vienna, 2008.
275. Kakii K. Involvement of Ca^{2+} in the flocculation of *Kluyvera cryocrescens* KA-103 / K. Kakii, M. Hasumi, T. Shirakashi, M. Kuriyama // J. Ferment. Bioeng. – 2004. – V. 69. – P. 224-227.
276. Kazuyuki M. Elastase activity of some purified protease preparations as related to their depilatory action / M. Kazuyuki, O. Tatsushi, T. Hiroshige // Agricultural and Biological Chemistry. – 1965. – V. 29, No 9. – P. 836-839.
277. Kiyoshi M. Studies on the proteolytic enzymes of thermophilic *Streptomyces*. Part I. Purification and some properties / M. Kiyoshi, J. Eifi, Y. Fumihiko // Agric. And Biol. Chem. – 1964. – V. 28, No 12. – P. 884-895.
278. Khafizov R.R. Physicochemical and microbiological characteristics of groundwater from observation wells of a deep radioactive liquid waste repository / R.R. Khafizov, A.B. Poltarau // Microbiology. – 2000. – V. 69. – P. 105-112.
279. Knapp G. Iodine losses during Winkler titrations / G. Knapp, M.C. Stalcup, R.J. Stanley // Deep-Sea res. – 1991. – V. 38. – P. 121-128.
280. Kolenbrander P.E. Surface recognition among oral bacteria: multigeneric coaggregations and their mediators / P.E. Kolenbrander // CRC Crit. Rev. Microbiol. – 1999. – V. 17. – P. 137-158.

281. Kolenbrander P.E. Potential role of functionally similar coaggregation mediators in bacterial succession / P.E. Kolenbrander, R.N. Andersen, D.L. Clemans, C.J. Whittaker // *Infect. Immun.* – 1999. – V. 38. – P. 171-186.
282. Kolenbrander P.E. Coaggregation of oral bacteroides species with other bacteria: central role in coaggregation bridges and competitions / P.E. Kolenbrander, R.N. Andersen, L.V. Holdeman // *Infect. Immun.* – 2002. – V. 48. – P. 741-746.
283. Kurylowicz W. Atlas of Ultrastructure of *Streptomyces* in Course of Biosynthesis of Antibiotics / W. Kurylowicz, W. Kurzatkowski, S.T. Williams, W. Woznicka, A. Paszkiewicz. - Warsaw, Polish Medical Publishers, 1975. – 347p.
284. Kwapinski J. Antigenic structure of the actinomycetales. XI. spectra of serological activities of the plasm antigens / J. Kwapinski // *Zentralb. Bacteriol.* – 1966. – V. 200. – P. 380-390.
285. La Mer V.K. The role of filtration in investigating flokkulation and redispersion / V.K. La Mer, T.W. Healy // *J.Phys.Chem.* – 1966. – V.67, No 11. – P.2417-2420.
286. Larkin M.J. Purification and characterization of a novel naphthalene dioxygenase from *Rhodococcus sp. strain NCIMB12038* / M.J. Larkin, C.R. Allen, L.A. Kulakov, D.A. Lipscomb // *J. Bacteriol.* – 1999. – V. 181. – P. 6200-6204.
287. Lieske R. Morphologie und Biologie der Strahlenpilze (*Aktinomyceten*) / R. Lieske. - Leipzig, Borntraeger, 1921. – 129p.
288. Lyklema, J. Electrophoretic mobility and hydrophobicity as a measure to predict the initial steps of bacterial adhesion / J. Lyklema, W. Norde, G. Schraa, A.J.B. Zehnder // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1997. – V. 53. – P. 1898-1901.
289. Madi L. Electron microscopic studies of aggregation and pellicle formation in *Azospirillum spp.* / L. Madi, M. Kessel, E. Sadovnik, Y. Henis // *Plant soil.* – 2002. – V. 109. – P. 115-121.
290. Makkar N. Actinoplanetes in soil and on plant litter from freshwater habitats / N. Makkar, T. Cross // *J. Appl. Bacteriol.* – 2003. – V. 52. – P. 209-218.

291. Meyrath J. Optimisation of Geast Production from Effluents using Flocculent strains; Curr. Dev. Yeast Res. Proc. 5th Jnt. Symp. Yeast. London, July 20-25. 1980 / J. Meyrath, R. Braun. – Toronto. – 1981. – P. 25-31.
292. Mikhailov A. The ecological aspects of peat utilization in Russia / A. Mikhailov, L. Davies // International Peat Symposium. – Finland. – 1998. – No 7. – P. 231-245.
293. Mincer T. J. Wideespread and persistent populations of a major new marine actinomycete taxon in oceansediments / T.J. Mincer, P.R. Jensen, C.A. Kauffman, W. Fenical // Appl. Environ. Microbiol. – 2002. – V. 68. – P. 5005- 5011.
294. Moran M. Evidence for indigenous Streptomyces populations in a marine environment determined with a 165rRNA probe / M. Moran, L.T. Rutherford, R.E. Hodson // Appl. Eviron. Microbiol. – 1995. V. 61. – P. 3695-3700.
295. Murayama K. Soluble Proteins from Fowl Feather Keratin / K. Murayama, K. Akahane, S. Morozono // J. Biochemical. – 1977. – Vol. 81, No 1. – P. 19-24.
296. Muzzareili R.A.A. Chelating, film-forming and coagulating ability of the chitosan-glucan complex from *Aspergillus niger* industrial wastes / R.A.A. Muzzareili, F. Tanfanl, G. Scarpini //Biotechnol. Bioeng. – 1980. –V.22, No 4. – P. 885-896.
297. Nickerson W.J. Keratinase I. Properties of the enzyme confugate elaborated by *Streptomyces fradiae* / W.J. Nickerson, J.J. Novoil, R.S. Robinson // Biochim et Biophys.acta. – 1963. – V. 77. – P.73 - 86.
298. Nir S. Van der Waals interactions between surfaces of biological interest / S. Nir // Prog. Surf. Sci. – 1998. – V. 8. – P. 1-58.
299. Ohshima H. On the electrophoretic mobility of biological cells / H. Ohshima, T. Kondo // Biophys. Chem. – 2001. – V. 39. – P. 191-198.
300. Oleskin A.V. Social behavior of microbial populations / A.V. Oleskin A // J. Basic Microbiol. – 1994. – V. 34, No 6. – P. 425-439.
301. Olofsson A.C. Floc stability and adhesion of green-fluorescent-protein-marked bacteria to flocs in activated sludge / A.C. Olofsson, A. Zita, M. Hermansson // Microbiology. – 1998. – V. 144. – P. 519-528.

302. Pagot J. Influence de la composition du milieu de culture sur la synthèse des enzymes protéolytiques par *Keratinomyces affelloi* Vanbar / J. Pagot // C.r. Acad. Sci. – 1967. – D. 265, No14. – P. 965-968.
303. Perret D. The diversity of natural hydrous iron oxides / D. Perret, J. Gaillard, O. Atteia // Environ. Sci. Technol. – 2000. – V. 34. – P. 3540-3546.
304. Peterson C.E. Soil and mine spoils fill as media for removal of nitrogen and phosphorus in domestic wastewater / C.E. Peterson, R.B. Renau, C. Hagedorn // Water, air and soil pollut. – 1998. – V. 102, No34. – P. 361-375.
305. Przylecki D.J. Chemical and functional protein / D.J. Przylecki // Biochem. – 1935. – V. 282. – 362p.
306. Rosenberg M. Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell surface hydrophobicity / M. Rosenberg, E. Rosenberg // FEMS Microbiol. – 1999. – V. 9. – P. 29-33.
307. Seffernick J.L. Substrate specificity of atrazine chlorohydrolase and atrazine-catabolizing bacteria / J.L. Seffernick, G. Johnson, M.J. Sadowsky, L.P. Wackett // Appl. Environ. Microbiol. – 2001. – V. 66. – P. 4247-4252.
308. Shapiro J.A. Sequential events in bacterial colony morphogenesis / J.A. Shapiro, D.I. Trubatch // Physica D. – 1991. – V. 49, No 12. – P. 214-223.
309. Sokolov I. Cell surface electrochemical heterogeneity of the Fe (III) – reducing bacteria / I. Sokolov, D.S. Smith, G.S. Henserson, Y.A. Gorby // Environ. Sci. Technol. – 2001. – V. 35. – P. 341-347.
310. Sponga F. Biodiversity and potentials of marine-derived microorganisms / F. Sponga, L. Cavaletti, A. Lazzarini // J. of Biotechnology. – 1999. – V. 70. – P. 6569.
311. Stratford M. Yeast flocculation: reconciliation of physiological and genetic viewpoints / M. Stratford // Yeast. – 1992. – V. 8. – P. 25-38.
312. Stratford M. Genetic aspects of yeast flocculation: in particular, the role of FLO genes in the flocculation of *Saccharomyces cerevisiae* / M. Stratford // Colloids Surf. – 1994. – V. 2. – P. 151-158.

313. Stratford M. Yeast flocculation: lectin synthesis and activation / M. Stratford, A. Carter // *Yeast*. – 1993. – V. 9. – P. 371-378.
314. Straver M.H. Induced cell surface hydrophobicity influences flocculation of brewer's yeast in a flocculation assay / M.H. Straver, G. Smit, J.W. Kijne // *Colloids Surf.* – 1994. – V. 2. – P. 173-180.
315. Straver M.H. Purification and partial characterization of a flocculin from brewer's yeast / M.H. Straver, G. Smit, J.W. Kijne // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1994. – V. 60. – P. 2754-2758.
316. Takiuchi J. Isolation of an extracellular proteinase (keratinase) from *Microsporum canis* / J. Takiuchi, D. Higuchi, Y. Sef, M. Koga // *Sabouraudia*. – 1982. – V. 20, No 4. – P. 281-288.
317. Tybussek R. Comparison of the continuous flotation performances of *Saccharomyces cerevisiae* LBG H620 and DSM 2155 strains / R. Tybussek, F. Linz, N. Mozes // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 1998. – V. 41. – P.13-22.
318. Vandervoorde L. Prevalence of coaggregation reactions among chicken lactobacilli / L. Vandervoorde, H. Christiaens, W. Verstraete // *J. Appl. Bacteriol.* – 2003. – V. 72. – P. 214-219.
319. Wackett L.P. Biocatalysis and biodegradation: microbial transformation of organic compounds / L.P. Wackett, C.D. Hershberger // ASM Press Washington, D.C. – 2001. – V. 50. – P. 817-849.
320. Wackett L.P. Biodegradation of atrazine and related triazine compounds: from enzymes to field studies / L.P. Wackett, M.J. Sadowsky, B. Martinez, N. Shapir // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2002. – V. 58. – P. 39-45.
321. Webster N. S. The culturable microbial community of the Great Barrier Reef sponge *Rhopaloeides odorabile* is dominated by an α -Proteobacterium / N.S. Webster, R.T. Hill // *Marine Biology*. – 2001b. – V. 138. – P. 843-851.
322. Westgate S. Kinetics of uptake of organic liquid substrates by microbial cells: a method to distinguish interfacial contact and mass-transfer mechanisms / S. Westgate, G. Bell, P. Halling // *Biotechnol. Lett.* – 1999. – V. 17. – P. 1013-1018.

323. Weyland H. Characteristics of actinomycetes isolated from marine sediments / H. Weyland // Actinomycetes. Proc. 4th Int. Symp. On actinomycete biology. / Ed. By Schaal K. P. and Pulverer G. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag. – Stuttgart, 1981. – P. 309-314.
324. Williams S.T. Numerical classification of *Streptomyces* and related genera / S.T. Williams, M. Goodfellow, E. Alderson, E.M. Wellington, // J. Gen. Microbiol. – 1998. – V. 129. – P. 1743-1813.
325. Wilson R.W. Clinical application of PCR-restriction enzyme pattern analysis for rapid denitrification of aerobic actinomycete isolates / R.W. Wilson, V.A. Steingrube, B.A. Brown, R.J. Wallace // Jr. J. Clin. Microbiol. – 1999. – V. 36. – P. 148-152.
326. Wong Jeng-Jie Bioimmobilization of keratinase using *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* systems / J.J. Wong, H.E. Swaisgcod, C.H. Shih Jason // Biotechnol. and Bioeng. – 2003. – V.81, No 4. – P. 421 - 429.
327. Yang Z. H. Culture medium and grading culture technics for biofloculant production by *Paenibacillus polymyxa* GAJ / Z.H. Yang, R. Tao, G.M. Zery, Y. Xiao, E.J. Deng // Huan Jing Ke Xue. – 2006. – V. 27, No 7. – P. 1444 - 1449.
328. Yu R.J. Keratinases: hydrolysis of keratinous substrates by three enzymes of *Trichophyton mentagrophytes* / R.J. Yu, J. Ragot, F. Blank // Experientia. –1972. – V. 28, No 12. – P. 1512-1513.
329. Yassin A.F. *Nocardia ignorata* species nov /A.F. Yassin, F.A. Rainey, U. Steiner // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2001. – V. 51. – P. 2127-2131.
330. Yokoi H. Optimum conditions of production of biofloculant by *Enterobacter* sp. BY-29 / H. Yokoi, S. Mori, J. Hirose, S. Hayashi, Y. Takasaki // Mem. Fac.Eng. Miyazaki Univ. – 2001. – No 30. – P. 41-45.
331. Yokota A. *Catenuloplanes japonicus* gen. nov., sp. nov., nom. rev., a new genus of the order Actinomycetales / A. Yokota, T. Tamura, T. Hasegawa, L. Huang // Int J. Syst. Bacteriol. – 1999. – V. 43. – P. 805-812.

332. Yoshida F. Continuous hydrocarbon fermentation with colloidal emulsion feed. A kinetic model for two-liquid phase culture / F. Yoshida, T. Yamane // *Biotechnology Bioeng.* – 2000. – V. 16. – P. 635-657.
333. Yucel Tokuz R. Biodegradation and removal of phenols in rotating biological contactors / R. Yucel Tokuz // *Water Sci. and Technol.* – 1989. – V. 21. – P. 1751-1754.
334. Zhang Y. Effect of a *Pseudomonas rhamnolipid* biosurfactant on cell hydrophobicity and biodegradation of octadecane / Y. Zhang, R. Miller // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1999. – V. 60. – P. 2101-2106.
335. Zhang T. Ying y ong yu huanjing shengwu xuebao / T. Zhang, W. Lu, C. Tian // *Chin J. Appl. and Environ. Biol.* – 2003. – V. 9, No 1. – P. 67 -70.
336. Zhou X. Yingyong yu huanjing shengwu xuebao / X. Zhou, L. Huang, J. Wang, J. Zhou, J. Zhang // *Chin. J. Appl. and Environ. Biol.* – 2003. – V.9, No 4. – P. 436 -438.
337. Zhu Y. B. Bioflocculant producing capability by two strain of *Bacillus sp.* in diversified carbon sources/ Y.B. Zhu, F. Ma, N.O. Ren, J.L. Huang, A.J. Wang // *Huan Jing Ke Xue.* – 2005. – V. 26, No 5. – P. 152 – 155.
338. Zita A. Effects of bacterial cell surface structure and hydrophobicity on attachment to activated sludge flocs / A. Zita, M. Hermansson // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1997. – V. 63. – P. 1168-1170.
339. [http://www.europarl.europa.eu/oeil/popups/ficheprocedure.do?lang=en&reference=2014/2208\(INI\)](http://www.europarl.europa.eu/oeil/popups/ficheprocedure.do?lang=en&reference=2014/2208(INI)).
340. <http://www.wrap.org.uk/content/reducing-food-waste-could-save-global-economy-300-billion-year>.
341. http://www.eorodinki.ru/voronezhskaya_oblast/pochvi/.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение А

«УТВЕРЖДАЮ»
 Директор ППЗ и ГПП (Ракитное)
 МПК «Ясные Зори»
 филиала ООО «Белгранкорм»,

 Г. А. Петран
 «15» МПК «Ясные Зори» 2015
 Печать

АКТ

о полупроизводственных испытаниях по апробированию
 способа биосорбционной очистки сточных вод

Мы, ниже подписавшиеся, ООО «Белгранкорм» (директор ППЗ и ГПП (Ракитное) Петран Г. А., зам. директора, гл. технолог ППЗ и ГПП (Ракитное) Маслова Ю. Ф., гл. инженер ППЗ и ГПП (Ракитное) Добродомов В. Н., ведущий специалист по ОТиТБ, эколог Апанасенко А. А., начальник участка теплотехники, водоснабжения, канализации и утилизации отходов Денежко Ю. М.), доцент кафедры безопасности жизнедеятельности, к.т.н. Брындина Л.В. (ВГЛТУ им. Морозова) составили настоящий акт о том, что в период с 12 по 15 мая 2015 г на территории ООО «Белгранкорм» были проведены испытания по очистке сточных вод биосорбционным способом с использованием культуры актиномицета *Streptomyces chromogenes* s.g. 0832.

Испытания проводили на локальных очистных сооружениях. Исходный состав сточных вод представлен в таблице 1.

Культура микроорганизма была подготовлена на кафедре биохимии и биотехнологии ВГУИТ.

В качестве посевного материала использовали 48-часовую культуру, выращенную на среде (г /дм³): картофельный крахмал – 20; соевая мука – 20; (NH₄)₂SO₄ – 3,0; CaCO₃ – 3,0; KH₂PO₄ – 0,5; NaCl – 2,5; pH среды 6,65. Культивирование проводили в глубинных условиях в колбах объемом 750 см³, содержащих 100 см³ среды, при 28-30⁰С на качалке (220-240 об/мин). Основную питательную среду состава, (г/дм³): картофельный крахмал – 50; соевая мука – 5; измельченное перо – 10; KH₂PO₄ – 0,8; CaCO₃ – 4,0; FeSO₄ – 0,01; ZnSO₄ – 0,02; засевали 5% по объему посевного материала и выращивали на качалке 48 часов

при рН среды 11,0 и температуре 28-30 °С.

В сточную воду объемом 1 дм³, предварительно прошедшую через вертикальную песколовку АЛП 3 и жируловитель ОВТ 5, вносили культуру актиномицета *Streptomyces chromogenes* s.g. 0832, в соотношении 2 - 5 % к объему стока.

Смесь перемешивали при частоте вращения $n = 1,6-1,8 \text{ с}^{-1}$ и выдерживали 0,5 – 1 ч., затем отделяли осадок от надосадочной жидкости фильтрацией. Физико-химический состав стока, прошедшего очистку, приведен в таблице 1.

Таблица 1

Показатели состава сточных вод	Физико-химический состав сточных вод			
	Концентрация веществ в сточной воде, мг/дм ³			
	До очистки	После очистки		По нормативным требованиям
		Существующий способ	Предлагаемый способ	
рН	7,96	6,7	7,0	6-8,5
ХПК, мг O ₂ / дм ³	606,8	109,2	78,9	350
Взвешенные вещества, мг/дм ³	54,0	9,7	8,9	15
БПК _{полн} , мг/ дм ³	317,4	57,1	16,4	90
Хлориды, мг/дм ³	269,7	48,6	10,7	350
Сульфаты, мг/дм ³	66,2	11,9	8,2	500
Сухой остаток, мг/дм ³	898,4	161,7	10,4	500
Азот аммонийный, мг/ дм ³	0,92	0,17	0,12	2,0
Азот нитратов, мг/дм ³	0,52	0,09	0,09	1,0
Азот нитритов, мг/дм ³	0,026	0,0047	0,003	1,0
Жиры, мг/ дм ³	20,1	0,38	0,09	20

Процесс очистки сточных вод проводили по схеме, представленной на рис.1.

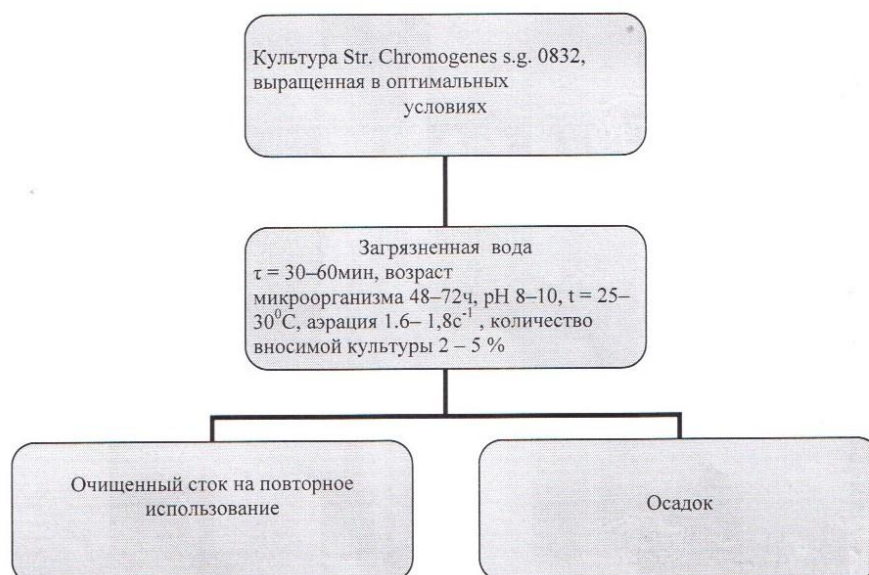


Рис.1. Схема очистки сточных вод биофлокулянт *Streptomyces chromogenes* s.g. 0832

В результате проведенных испытаний установлено, что очистка сточных вод предлагаемым способом повышает эффективность очистки сточных вод по ряду показателей: значение ХПК снижается на 87%, БПК – на 94,8% от исходного. Предлагаемый способ может быть рекомендован к внедрению на предприятиях мясной отрасли.

Члены комиссии:

Зам. директора, главный технолог
ППЗ и ГПП (Ракитное) МПК «Ясные Зори»
филиала ООО «Белгранкорм», к.т.н.

 Ю.Ф. Маслова

Главный инженер ППЗ и ГПП (Ракитное)

 В.Н. Добродомов

Ведущий специалист по ОТиТБ, эколог
ООО «Белгранкорм»

 А. А. Апанасенко

Начальник участка теплотехники, водоснабжения,
канализации и утилизации отходов
ООО «Белгранкорм»

 Ю. М. Денежко

Доцент кафедры безопасности жизнедеятельности
ФГБОУ ВО «ВГЛУ» им. Морозова, к.т.н.

 Л. В. Брындина

«УТВЕРЖДАЮ»
 ООО «Петровский мясокомбинат»
 Воронежская обл.,
 С.Новая Усмань
 директор по производству
 Хачирова Е.Д.
 «мас» 2015г.



АКТ

о полупроизводственных испытаниях по апробированию
 способа биосорбционной очистки сточных вод

Мы, ниже подписавшиеся, директор по производству Хачирова Е.Д., заведующий кафедрой микробиологии и биохимии д.б.н., проф. Корнеева О.С. (ВГУИТ), доцент кафедры безопасности жизнедеятельности, к.т.н. Брындина Л.В. (ВГЛУ им. Морозова) составили настоящий акт о том, что в период с 25 по 29 мая 2015 г на территории ООО «Петровский мясокомбинат» были проведены испытания по очистке сточных вод биосорбционным способом с использованием культуры актиномицета *Streptomyces chromogenes* s.g. 0832. Испытания проводили на локальных очистных сооружениях. Исходный состав сточных вод представлен в таблице.

Культура микроорганизма была подготовлена на кафедре микробиологии и биохимии ВГУИТ. В качестве посевного материала использовали 48-часовую культуру, выращенную на среде (г /дм³): картофельный крахмал – 20; соевая мука – 20; (NH₄)₂SO₄ – 3,0; CaCO₃ – 3,0; KH₂PO₄ – 0,5; NaCl – 2,5; pH среды 6,65. Культивирование проводили в глубинных условиях в колбах объемом 750 см³, содержащих 100 см³ среды, при 28-30⁰С на качалке (220-240 об/мин). Основную питательную среду состава, (г/дм³): картофельный крахмал – 50; соевая мука – 5; измельченное перо – 10; KH₂PO₄ – 0,8; CaCO₃ – 4,0; FeSO₄ – 0,01; ZnSO₄ – 0,02; ОГТАС (отходы гальванического травления алюминиевых сплавов – коагулянт Al³⁺) – 0,003 засевали 5% по объему посевного материала и выращивали на качалке 48 часов при pH среды 11,0 и температуре 28-30⁰С.

В сточную воду объемом 100 м³, предварительно прошедшую через вертикальную песколовку АЛП 3 и жироловитель ОБТ 5, вносили культуру актиномицета *Streptomyces chromogenes* s.g. 0832, в соотношении 2 - 5 % к объему стока.

Смесь перемешивали при частоте вращения $n = 1,6-1,8 \text{ с}^{-1}$ и выдерживали 0,5 - 1ч., затем отделяли осадок от надосадочной жидкости фильтрацией. Физико-химический состав стока, прошедшего очистку, приведен в таблице. Процесс очистки сточных вод проводили по схеме, представленной на рисунке.

Таблица

Физико-химический состав сточных вод

Показатели состава сточных вод	Концентрация веществ в сточной воде, мг/дм ³			
	До очистки	После очистки		По нормативным требованиям
		Существующий способ	Предлагаемый способ	
рН	7,96	7,36	6,85	6-8,5
ХПК, мг О ₂ / дм ³	649,2	7,6	59,0	350
Взвешенные вещества, мг/дм ³	188,9	6,88	7,1	15
БПК _{полн} , мг/дм ³	260,0	27,0	13,1	90
Хлориды, мг/дм ³	761,6	415,9	8,6	350
Сульфаты, мг/дм ³	116,0	82,5	6,6	500
Сухой остаток, мг/дм ³	1518,5	870,0	8,3	500
Азот аммонийный, мг/дм ³	30,8	1,85	0,1	2,0
Азот нитратов, мг/дм ³	14,45	23,75	0,07	1,0
Азот нитритов, мг/дм ³	0,12	0,13	0,0024	1,0
Жиры, мг/дм ³	9,0	0,7	0,07	20

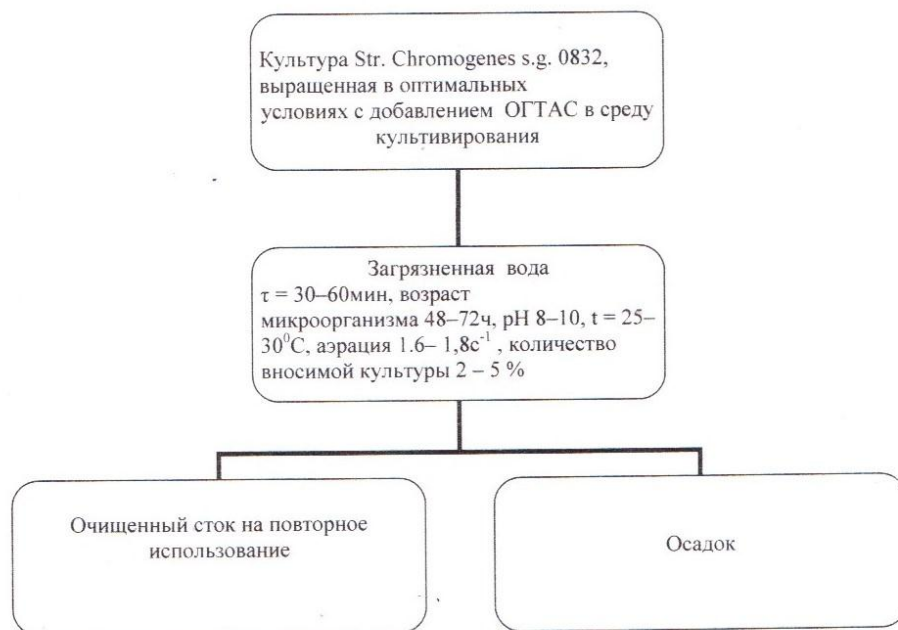


Рис. Схема очистки сточных вод биофлокулянтom *Streptomyces chromogenes* s.g. 0832

В результате проведенных испытаний установлено, что очистка сточных вод предлагаемым способом повышает эффективность очистки сточных вод по ряду показателей: значение ХПК снижается на 90,3%, БПК – на 95,9% от исходного. Предлагаемый способ может быть рекомендован к внедрению на предприятиях мясной отрасли.

Директор по производству



Хачирова Е.Д.

Зав. кафедрой микробиологии и биохимии ВГУИТ, д.б.н., проф.



Корнеева О.С.

Доцент кафедры безопасности жизнедеятельности ВГЛУ им. Морозова, к.т.н.



Брындина Л.В.

«УТВЕРЖДАЮ»
 ООО «Петровский мясокомбинат»
 Воронежская обл.,
 Новая Усмань
 директор по производству
 Хачирова Е.Д.
 «22» «мая» 2015г.

АКТ

о полупроизводственных испытаниях по апробированию
 способа биосорбционной очистки сточных вод

Мы, ниже подписавшиеся, директор по производству Хачирова Е.Д., заведующий кафедрой микробиологии и биохимии д.б.н., проф. Корнеева О.С. (ВГУИТ), доцент кафедры безопасности жизнедеятельности, к.т.н. Брындина Л.В. (ВГЛТУ им. Морозова) составили настоящий акт о том, что в период с 18 по 22 мая 2015 г на территории ООО «Петровский мясокомбинат» были проведены испытания по очистке сточных вод биосорбционным способом с использованием культуры актиномицета *Streptomyces chromogenes* s.g. 0832. Испытания проводили на локальных очистных сооружениях. Исходный состав сточных вод представлен в таблице.

Культура микроорганизма была подготовлена на кафедре микробиологии и биохимии ВГУИТ. В качестве посевного материала использовали 48-часовую культуру, выращенную на среде (г /дм³): картофельный крахмал – 20; соевая мука – 20; (NH₄)₂SO₄ – 3,0; CaCO₃ – 3,0; KН₂PO₄ – 0,5; NaCl – 2,5; pH среды 6,65. Культивирование проводили в глубинных условиях в колбах объемом 750 см³, содержащих 100 см³ среды, при 28-30⁰С на качалке (220-240 об/мин). Основную питательную среду состава, (г/дм³): картофельный крахмал – 50; соевая мука – 5; измельченное перо – 10; KН₂PO₄ – 0,8; CaCO₃ – 4,0; FeSO₄ – 0,01; ZnSO₄ – 0,02; ПАА – 0,003 засеивали 5% по объему посевного материала и выращивали на качалке 48 часов при pH среды 11,0 и температуре 28-30⁰С.

В сточную воду объемом 100 м³, предварительно прошедшую через вертикальную песколовку АЛП 3 и жирословитель ОВТ 5, вносили культуру актиномицета *Streptomyces chromogenes* s.g. 0832, в соотношении 2 - 5 % к объему стока.

Смесь перемешивали при частоте вращения $n = 1,6-1,8 \text{ с}^{-1}$ и выдерживали 0,5 - 1ч., затем отделяли осадок от надосадочной жидкости фильтрацией. Физико-химический состав стока, прошедшего очистку, приведен в таблице. Процесс очистки сточных вод проводили по схеме, представленной на рисунке.

Таблица

Физико-химический состав сточных вод

Показатели состава сточных вод	Концентрация веществ в сточной воде, мг/дм ³			
	До очистки	После очистки		По нормативным требованиям
		Существующий способ	Предлагаемый способ	
рН	7,96	7,36	7,0	6-8,5
ХПК, мг О ₂ / дм ³	649,2	7,6	47,9	350
Взвешенные вещества, мг/дм ³	188,9	6,88	5,8	15
БПК _{полн.} , мг/ дм ³	260,0	27,0	10,7	90
Хлориды, мг/дм ³	761,6	415,9	7,0	350
Сульфаты, мг/дм ³	116,0	82,5	5,3	500
Сухой остаток, мг/дм ³	1518,5	870,0	6,8	500
Азот аммонийный, мг/ дм ³	30,8	1,85	0,08	2,0
Азот нитратов, мг/дм ³	14,45	23,75	0,06	1,0
Азот нитритов, мг/дм ³	0,12	0,13	0,002	1,0
Жиры, мг/ дм ³	9,0	0,7	0,06	20

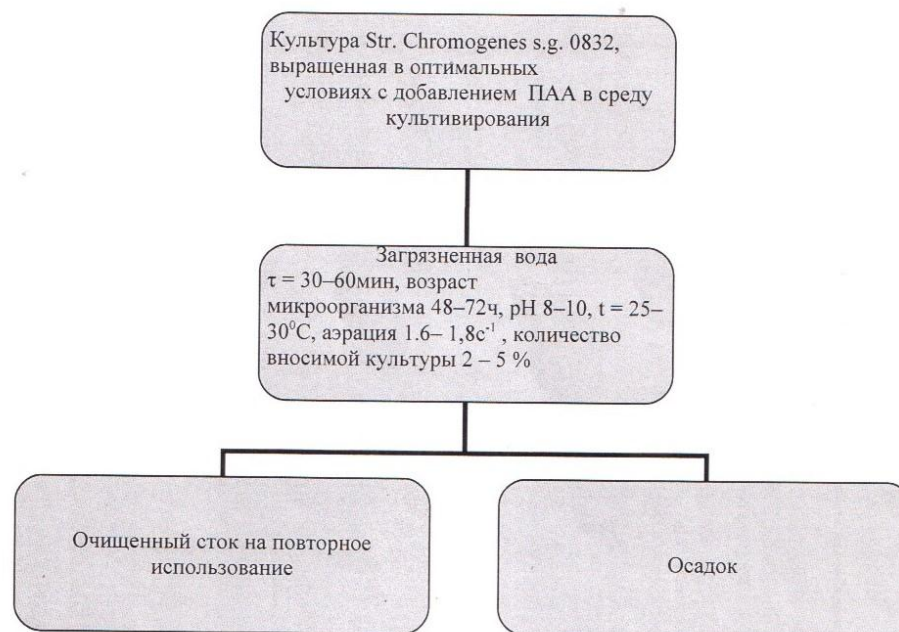


Рис. Схема очистки сточных вод биофлокулянтom *Streptomyces chromogenes* s.g. 0832

В результате проведенных испытаний установлено, что очистка сточных вод предлагаемым способом повышает эффективность очистки сточных вод по ряду показателей: значение ХПК снижается на 92%, БПК – на 98% от исходного. Предлагаемый способ может быть рекомендован к внедрению на предприятиях мясной отрасли.

Директор по производству

Хачирова Е.Д.

Зав. кафедрой микробиологии и
биохимии ВГУИТ, д.б.н., проф.

Корнеева О.С.

Доцент кафедры безопасности
жизнедеятельности ВГЛТУ им. Морозова, к.т.н.

Брындина Л.В.