Учреждение образования
«БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Р. М. Маркевич, И. А. Гребенчикова, М. В. Рымовская

ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ

ЛАБОРАТОРНЫЙ ПРАКТИКУМ

Рекомендовано
учебно-методическим объединением по образованию
в области природопользования и лесного хозяйства
в качестве учебно-методического пособия
для студентов учреждений высшего образования
по специальности 1-57 01 03 «Биоэкология»

Минск 2015

УДК 606:628(075.8)(076.5)
ББК 38.761.2я73
М26

Р е ц е н з е н т ы:
кафедра общей экологии и методики преподавания биологии Белорусского государственного университета (кандидат биологических наук, доцент *Т. А. Макаревич*);
кандидат биологических наук, доцент, заведующая кафедрой экологической медицины и радиобиологии учреждения образования «Международный государственный экологический университет имени А. Д. Сахарова» *Н. В. Прокопенко*

Все права на данное издание защищены. Воспроизведение всей книги или ее части не может быть осуществлено без разрешения учреждения образования «Белорусский государственный технологический университет».

Маркевич, Р. М.

М26 Экологическая биотехнология. Лабораторный практикум : учеб.-метод. пособие для студентов специальности 1-57 01 03 «Биоэкология» / Р. М. Маркевич, И. А. Гребенчикова, М. В. Рымовская. – Минск : БГТУ, 2015. – 217 с.

ISBN 978-985-530-469-3.

Учебно-методическое пособие включает теоретический материал и лабораторные работы, посвященные применению биотехнологии для решения проблем окружающей среды.

В теоретической части каждого раздела представлены сведения о современных направлениях экологической биотехнологии: совершенствовании биологической очистки сточных вод в аэробных и анаэробных условиях, переработке промышленных и растительных отходов с получением ценных продуктов. Рассмотрены методы получения биоразлагаемых полимерных материалов.

Лабораторные работы построены на моделировании производственных биотехнологических процессов переработки и утилизации сточных вод, жидких и твердых сельскохозяйственных и промышленных отходов, предусматривают оценку воздействия токсичных веществ на состояние окружающей среды. Работы включают химические, биохимические и гидробиологические методы контроля производства.

УДК 606:628(075.8)(076.5)
ББК 38.761.2я73

ISBN 978-985-530-469-3

© УО «Белорусский государственный технологический университет», 2015
© Маркевич Р. М., Гребенчикова И. А., Рымовская М. В., 2015

ПРЕДИСЛОВИЕ

Основные направления экологической биотехнологии как науки о специфическом применении методов и средств биотехнологии для решения проблем окружающей среды изложены в учебном пособии «Экологическая биотехнология» авторов Н. С. Ручая, Р. М. Маркевич. Лабораторный практикум является неотъемлемым приложением к данному пособию, поскольку в нем получили продолжение основные теоретические положения экологической биотехнологии, освещены современные представления о процессах биологической очистки сточных вод и переработки отходов, получения биотоплива, воздействия пестицидов на микробиоту почвы, биоразлагаемых полимерных материалах и методах определения их биостойкости и др.

Каждая из семи глав лабораторного практикума содержит теоретическую часть и одну или две лабораторные работы, моделирующие производственные процессы. Особенностью лабораторного практикума является многовариантность выполнения всех лабораторных работ: использование разного сырья, различных микроорганизмов-продуцентов, варьирование условий осуществления биотехнологических процессов. Такой подход позволяет включать в лабораторный практикум элементы исследований, обеспечивает выполнение лабораторных работ разного уровня сложности.

Лабораторный практикум соответствует учебной программе дисциплины «Экологическая биотехнология» и предназначен для овладения обучающимися по специальности 1-57 01 03 «Биоэкология» основными практическими навыками управления производственными процессами, выделения и очистки продуктов, а также методами химического, биохимического и микробиологического контроля биотехнологических процессов.

1 СОВРЕМЕННЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ОЧИСТКИ СТОЧНЫХ ВОД В АЭРОБНЫХ УСЛОВИЯХ

1.1. Совершенствование биотехнологий совместного удаления из сточных вод азота и фосфора

С целью повышения эффективности и обеспечения стабильности процессов биологического удаления из сточных вод азота и фосфора технологические схемы совершенствуются в направлении увеличения содержания летучих жирных кислот, установления низкого уровня нитратов и кислорода в анаэробной зоне и оптимального времени пребывания сточной воды в соответствующих зонах аэротенка, повышения концентрации микроорганизмов активного ила в определенных зонах путем закрепления их на насадке.

1.1.1. Ацидофикация сырого осадка с целью увеличения содержания летучих жирных кислот

В качестве основной причины нестабильности процесса биологического удаления фосфора отмечается низкое содержание и существенное колебание концентрации легкоокисляемых органических соединений в поступающих сточных водах. Низкое соотношение концентраций органических веществ и аммонийного азота, а также фосфора фосфатного затрудняет использование при очистке сточных вод технологических решений, принятых в Западной Европе и США.

Увеличить содержание легкоокисляемых органических веществ в поступающих на биологическую очистку сточных водах можно путем подачи их в аэротенк без предварительного отстаивания либо подачей в анаэробную зону химических соединений (метанола, уксусной кислоты). Такие мероприятия приводят к росту энергетических или эксплуатационных затрат.

Использование ацидофикации (преферментации) сырого осадка позволяет увеличить содержание летучих жирных кислот (ЛЖК) в поступающих на биологическую очистку сточных водах, после чего сточные воды, обогащенные летучими жирными кислотами, подаются в анаэробную зону. Такая технология внедрена на Люберецких очистных сооружениях Москвы в 2009 г. Для реализации данной технологии изменены эксплуатационные режимы первичных отстойников: часть отстойников выполняет функцию осветления сточной воды, другая часть переведена в режим уплотнения сырого осадка. Сливная вода с отстойников-уплотнителей, содержащая продукты ацидификации, совместно с осветленной водой направляется в аэротенк, при этом содержание летучих жирных кислот в воде увеличивается с 17–22 до 25–30 мг/дм^3. Внедрение ацидофикации сырого осадка позволило повысить стабильность работы аэротенков и обеспечить следующие показатели качества очищенных сточных вод, мг/дм^3: содержание азота аммонийного – 0,7, азота нитритного – 0,03, азота нитратного – 7,7, фосфора фосфатного – 0,2.

Новым способом является организация процесса ацидофикации в первой анаэробной зоне аэротенка. Там при отсутствии перемешивания иловой смеси формируется уплотненный слой активного ила, что сопровождается преферментацией сорбированного на иле органического вещества. При этом анаэробная зона продолжает выполнять свою основную функцию, связанную с высвобождением фосфатов за счет потребления летучих жирных кислот фосфораккумулирующими бактериями. Увеличение содержания летучих жирных кислот в иловой смеси в анаэробной зоне способствует более стабильному удалению фосфатов из очищаемых сточных вод. По сравнению с проведением ацидофикации в отстойниках такая организация процесса более экономична, поскольку нет необходимости строительства или реконструкции дополнительных емкостей (отстойников, преферментаторов) и экономятся затраты на перемешивание.

1.1.2. Технологическая схема с биокоагулятором

В соответствии с данной технологией первым сооружением в схеме является биокоагулятор (рис. 1.1), где исходные сточные воды контактируют с циркулирующим активным илом в условиях аэрации, после чего иловая смесь поступает в первичный отстойник. Осветленные воды из первичного отстойника направляются в денитрификатор, а поток активного ила сначала проходит обработку в анаэробном биореакторе (АНБР), затем также подается в денитрификатор.

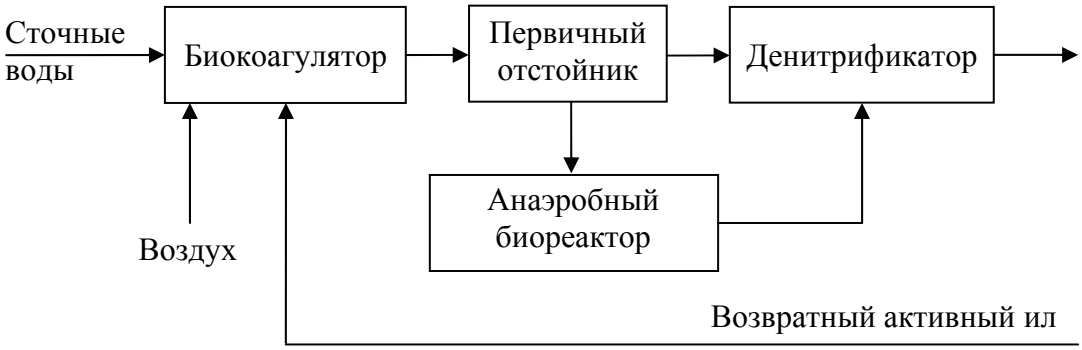


Рис. 1.1. Технологическая схема с биокоагулятором

Таким образом, в данной схеме анаэробные условия, необходимые для биологического удаления фосфора, создаются не в иловой смеси, а в потоке активного ила. Установлена возможность получения более высоких и стабильных показателей эффективности очистки схемы с АНБР по сравнению с другими технологическими схемами.

1.1.3. Ступенчатая денитрификация

Еще одним направлением совершенствования технологических схем для удаления азота и фосфора является система ступенчатой подачи сточных вод для денитрификации, не требующая рециркуляции, а значит, установки дополнительных насосов или мешалок (рис. 1.2). Согласно этой системе, сточные воды подаются в два или более реакторов, имеющих зону перемешивания и зону аэрации.

Возвратный ил и часть сточных вод поступают в зону перемешивания, а затем в зону аэрации первого реактора. В зону перемешивания второго реактора подаются иловая смесь из зоны аэрации первого реактора и вторая часть сточных вод. Из этой зоны

иловая смесь направляется в зону аэрации второго реактора. В зависимости от установившегося режима зоны перемешивания могут быть аноксидными или анаэробными.

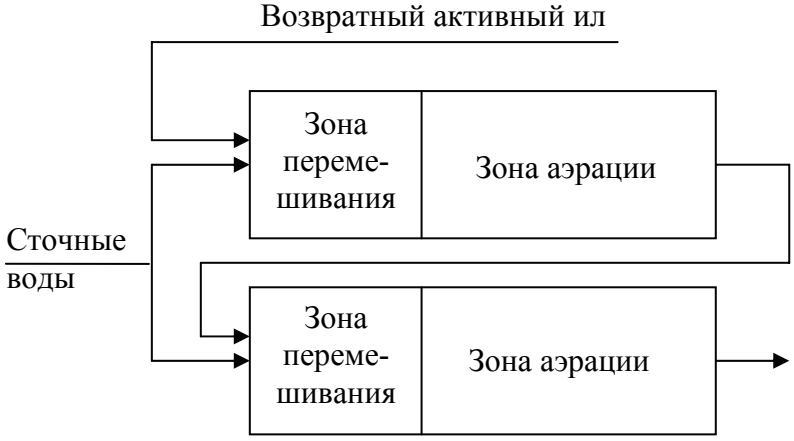


Рис. 1.2. Технологическая схема ступенчатой подачи сточных вод для денитрификации

Эффективность удаления азота и фосфора зависит от стабильности режима перемешивания. Система двухступенчатой денитрификации позволяет использовать уже построенные сооружения, производить работы по реконструкции на одном аэротенке без отключения всех сооружений. Для перемешивания рекомендуется пневматическое устройство «АКВА-МИКС» с низкой эффективностью переноса кислорода. Использование системы ступенчатой подачи сточных вод для денитрификации на очистных сооружениях Санкт-Петербурга, Набережные Челны, Бузулука, Шостка позволило достичь высокого качества очистки по соединениям азота. Эффективность удаления фосфора также выше расчетной, хотя и не получен эффект глубокой биологической дефосфотации.

1.1.4. Энергосберегающая технология (с карусельной зоной)

При выборе варианта реконструкции действующих очистных сооружений кроме обеспечения эффективного удаления азота и фосфора уделяется внимание минимизации энергетических затрат при внедрении новых технологий. Так, на Курьяновской станции аэрации (Москва) реализована схема реконструкции аэротенка, позволяющая эксплуатировать его в режиме биологического удаления азота и фосфора.

В соответствии с данной схемой в четырехкоридорном аэротенке выделены три технологические зоны. Первый коридор (зона денитрификации) разделен двумя продольными перегородками, что позволяет уменьшить площадь живого сечения и, как следствие, увеличить скорость потока до значений, обеспечивающих поддержание ила во взвешенном состоянии. Для полного перемешивания иловой смеси установлены две горизонтальные мешалки. Из второго и третьего коридоров образована вторая (карусельная) зона, предназначенная для протекания процессов нитри- и денитрификации. Применение карусели позволяет уменьшить количество мешалок, необходимых для поддержания активного ила во взвешенном состоянии, и снизить энергетические затраты. Установленная аэрационная система обеспечивает работу в режиме частого включения-выключения подачи воздуха. Третья зона аэротенка (четвертый коридор) работает с постоянной аэрацией и является нитрификатором. Предусмотрен рецикл иловой смеси из конца зоны нитрификации (четвертый коридор) в начало зоны денитрифицикации (первый коридор). Перевод аэротенка с классической схемы удаления органических соединений в режим нитри- и денитрификации не требует снижения производительности сооружения. Реконструированный по вышеприведенной схеме аэротенк может работать в режиме биологического удаления фосфора. Для этого $^{2}/_{3}$ первого коридора отводится под анаэробную зону, в которую поступают сточные воды и возвратный активный ил, нитратный рецикл направляется в третью часть первого коридора. С целью обеспечения фосфораккумулирующих бактерий легкодоступной органикой в первый коридор подаются неосветленные сточные воды, что позволяет снизить содержание фосфора в очищенной воде с 0,48–3,40 мг/дм^3 (при подаче осветленных сточных вод) до 0,10–0,45 мг/дм^3 (при подаче неосветленных сточных вод).

Как отмечено выше, преимуществом карусели являются невысокие энергетические затраты на поддержание активного ила во взвешенном состоянии. Вместе с тем такая схема имеет и недостатки. Если аэробная зона выполнена в виде карусели, т. е. представляет собой реактор практически полного перемешивания, то часть входящего потока ненитрифицированной иловой смеси может попадать сразу во вторичный отстойник, что периодически приводит к проскоку сточных вод с высокой концентрацией ам-

монийного азота. Кроме того, даже при концентрации растворенного кислорода 0,8–1,0 мг/дм^3 в конце зоны нитрификации происходит заброс кислорода в начало аноксидной зоны, что вызывает аэробное окисление наиболее доступной из имеющейся органики. Это может привести к нарушению денитрификации и биологической дефосфотации, поскольку, согласно общепринятым представлениям, для удаления 1 мг фосфора необходимо от 14 до 20 мг легкоокисляемой органики, а для восстановления 1 мг азота нитратов – от 3 до 5 мг $БПК_5$. Таким образом, биореактор с карусельной зоной не обеспечивает необходимой стабильности очистки от нитратов и (или) фосфатов на низкоконцентрированных по органическим загрязнениям сточных водах. В биореакторе-вытеснителе процессы биологической денитрификации и дефосфотации происходят существенно эффективнее.

1.1.5. Автотрофный процесс Анаммокс

Наряду с процессами биологической нитрификации и денитрификации возможны иные механизмы удаления азота из сточных вод. В последние годы был открыт автотрофный процесс Анаммокс (Anammox – ANaerobicAMMonium OXidation), основанный на способности автотрофных бактерий окислять аммонийный азот, используя нитриты в качестве акцептора электронов. В результате этого процесса также образуется молекулярный азот, а существенным отличием является отсутствие потребности в каком-либо органическом субстрате, что чрезвычайно важно для очистки от азота сточных вод, обедненных органическими загрязнениями. Для реализации данного процесса с целью удаления аммонийного азота необходимо часть его окислить до нитритов.

1.1.6. Реализация процессов нитри- и денитрификации в одном объеме

Процессы нитрификации и денитрификации могут быть реализованы в одном и том же объеме свободноплавающим илом. Это упрощает инженерное оформление, но связано с уменьшением существующих мощностей на 25–30%. Кроме того, для реализации процессов нитри- и денитрификации в одном объеме биореактора требуется строгое регулирование концентрации растворенного кислорода, т. е. необходима специальная контрольно-измерительная аппаратура и автоматизация управления.

1.1.7. Использование повышенных доз активного ила

При реализации процессов совместного биологического удаления азота и фосфора требуется большее время пребывания сточных вод в сооружениях биологической очистки, что ведет к необходимости увеличения их объема на 20–30%. Кроме того, вследствие возрастания илового индекса должно быть увеличено количество вторичных отстойников. Это вызывает необходимость разработки технологий, обеспечивающих эффективность очистки сточных вод от биогенных элементов без увеличения объемов сооружений, в частности за счет увеличения дозы активного ила (до 4,5–6,5 мг/дм^3), полученной селекционным методом.

Для реализации процесса глубокого удаления фосфора из сточных вод при эксплуатации аэротенков с повышенными дозами активного ила необходимо время пребывания в анаэробной зоне сооружения 1 ч, и общий возраст ила должен составлять от 12 до 19 сут. С целью культивирования активного ила с пониженными значениями илового индекса нагрузка по органическим загрязнениям была увеличена в 1,5–2 раза для интенсивного накопления биомассы и последующего выноса из вторичного отстойника медленно оседающих фракций ила, что приводит к снижению значений илового индекса. Была достигнута доза ила 6,5–7,0 мг/дм^3 и значение илового индекса 80–90 см^3/г, хлопья ила имели компактную форму, нитчатые бактерии практически отсутствовали. В лабораторных и промышленных испытаниях показана высокая эффективность удаления азота аммонийного (98–99%) и фосфора фосфатного (81–90%) при использовании повышенных доз активного ила.

1.1.8. Концентрирование биомассы путем комбинации взвешенных и прикрепленных форм микроорганизмов

Технология последовательного чередования анаэробной, аноксидной и анаэробной зон при реконструкции существующих сооружений биологической очистки снижает их производительность на 35–40%, а при строительстве новых сооружений их строительный объем увеличивается на 60–65%. Кроме того, многовариантная система рециклов из различных зон обработки чрезвычайно усложняет эксплуатацию и на 50% повышает затраты на обслуживание.

С точки зрения инженерных и технологических решений приемлемым является метод концентрирования биомассы путем ком-

бинации в реакторах биологической очистки взвешенных и прикрепленных на инертных носителях форм микроорганизмов. Вследствие значительного повышения концентрации и возраста активной биомассы в очистной системе, а также создания различных кислородных условий в толще прикрепленной биологической пленки технология с иммобилизацией микробного биоценоза обеспечивает: высокую окислительную мощность сооружений очистки и значительное сокращение их объема и ресурсозатрат; возможность эффективного протекания в одном объеме как процессов биодеструкции органических загрязняющих веществ, так и процессов нитри- и денитрификации и биологического удаления соединений фосфора; повышение надежности и стабильности работы биосистемы и минимизацию явлений вспухания активного ила.

1.1.9. Гибкая адаптивная система расположения блоков очистки

Для вновь создаваемых канализационных очистных сооружений рекомендуется гибкая адаптивная схема расположения блоков под названием «Uni», показанная на рис. 1.3. Адаптивная система при прочих равных условиях обеспечивает лучшие результаты обработки по сравнению со статичными системами и системами с программным или ручным управлением.

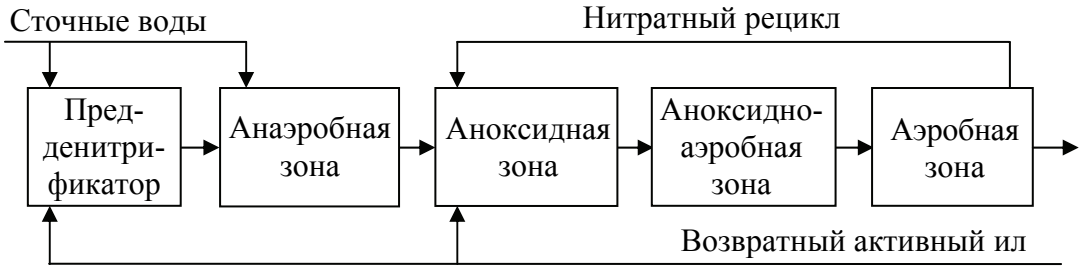


Рис. 1.3. Гибкая адаптивная схема расположения блоков «Uni»

Согласно этой схеме, циркулирующий активный ил распределяется между предденитрификатором и основным денитрификатором в зависимости от содержания нитратов в иле. Для денитрификации ила в предденитрификатор подается часть сточных вод в соответствии с потребностью в необходимом количестве органических веществ для денитрификации (8–10 мг $БПК_5$ на 1 мг азота нитратов). Остальная часть сточных вод направляется в дефосфотатор,

где в анаэробных условиях фосфор выделяется из клеток бактерий. Рециркуляция нитратсодержащей иловой смеси включается периодически при излишнем накоплении нитратов в оксидной зоне, либо постоянно. В системе возможно использование реагентов для более глубокой очистки сточных вод от фосфора.

Схема «Uni» в случае применения современных компьютерных комплексов мониторинга и контроля параметров сточных вод и очищенной воды в режиме реального времени позволяет реализовать адаптивную систему очистки, оперативно реагирующую на изменения внешних и внутренних параметров.

1.1.10. Раздельное уплотнение и обезвоживание осадка первичных отстойников и избыточного активного ила

Значительное влияние на качество очистки сточных вод от фосфора оказывают вторичные загрязнения. Совместное уплотнение осадка первичных отстойников и избыточного ила имитирует процессы вытеснения фосфора в анаэробной зоне, в результате этого вынос фосфатов с иловой водой приводит к повышению концентрации фосфора в очищенной воде. Еще худшие результаты наблюдаются при длительном пребывании в резервуарах смеси осадка и ила.

Для предотвращения появления вторичных загрязнений была внедрена система раздельного уплотнения и обезвоживания осадков. Продолжительность уплотнения избыточного ила сокращена до 5–7 ч во избежание выноса фосфора. Обезвоживание осадков возможно осуществлять последовательно, т. е. сначала избыточный ил, а затем осадок первичных отстойников, так как длительное хранение осадка не влияет на вынос фосфора. Раздельное уплотнение ила и осадка при раздельном их обезвоживании позволило снизить уровень загрязненности сливных вод и фугата по фосфору до уровня 10–20 мг/дм^3, что благоприятно отражается на конечных результатах очистки.

1.1.11. Интенсификация ацидофикации в анаэробной зоне

С целью интенсификации процесса ацидофикации в анаэробной и аноксидной зонах размещается плоскостная загрузка. При размещении загрузки в анаэробной зоне на ней вырастает биопленка специфического микробного ценоза, которая содержит преимущественно анаэробные гетеротрофные бактерии, адаптиро-

ванные к поступающим в зону органическим веществам и обеспечивающие их быструю деструкцию. Высокая устойчивость прикрепленных микроорганизмов к неблагоприятным воздействиям, связанным с изменениями характеристик поступающих стоков, увеличивает стабильность процесса ацидофикации и уменьшает риск срыва процесса биологической дефосфотации.

1.2. Применение аэробного гранулированного активного ила

1.2.1. Преимущества использования аэробного гранулированного активного ила

Технология биологической очистки сточных вод с применением гранулированного активного ила – перспективное направление развития современных биотехнологий очистки сточных вод, ориентированное на повышение эффективности и стабильности биологической очистки воды при увеличении окислительной мощности очистных сооружений, а также на снижение капитальных и эксплуатационных затрат.

Гранулированный ил имеет ряд преимуществ по сравнению с обычным активным илом:

1) облегчение разделения очищенной воды и активного ила при отстаивании;

2) гранулированный активный ил более устойчив к повышенным нагрузкам по загрязняющим веществам и наличию токсичных веществ;

3) возможность использования более высокой нагрузки на единицу объема сооружения за счет повышенных концентраций активного ила;

4) уменьшение вспухаемости и пенообразования в аэротенках;

5) улучшение фильтрационных свойств ила при его обезвоживании;

6) минимальное образование избыточной биомассы и, как следствие, уменьшение энергетических затрат на обработку образующегося осадка;

7) повышение производительности реакторов с минимальным выносом взвешенных веществ из реакторов и вторичных отстойников;

8) увеличение окислительной мощности очистных сооружений без возрастания капитальных и эксплуатационных затрат;

9) реализация технологий с гранулированным активным илом позволяет решать вопросы реконструкции очистных сооружений под перспективные технологии удаления биогенных элементов без увеличения существующих объемов сооружений. Предоствляется возможность сокращать площади очистных сооружений в 1,5–2 раза;

10) при использовании аэробного гранулированного ила возможно достижение очистки сточных вод по аммонийному азоту до 99%, фосфатам фосфора – до 85%, взвешенным веществам – до 95%.

1.2.2. Факторы, влияющие на формирование аэробного гранулированного активного ила

Впервые технология очистки сточных вод с помощью гранулированного активного ила была применена в 70-х гг. прошлого века для анаэробной обработки промышленных сточных вод. В конце 90-х гг. были разработаны принципы получения аэробных гранул, обеспечивающих эффективное протекание процессов удаления загрязнений из сточной воды. Согласно литературным данным, аэробные гранулы активного ила стратифицированы, т. е. во внешних слоях располагаются аэробные гетеротрофы и нитрификаторы, а денитрификаторы и фосфатаккумулирующие денитрифицирующие бактерии – внутри гранулы. Такая структура обусловлена глубиной проникновения субстратов и кислорода в биопленку. Основными условиями для получения гранулированного ила являются процесс циклического (периодического) действия, восходящий поток сточной воды, а также ограниченное время для седиментации.

Гранулы активного ила имеют ровные края и округлую форму, методом световой флуоресцентной микроскопии показано, что гранула представляет собой сферическую биопленку, окружающую биомассу отмерших микроорганизмов активного ила. Структура гранул подтверждена с применением электронного микроскопа. В середине гранул просматриваются отмершие клетки микроорганизмов, видимые как пустые округлые образования и обрывки цитоплазматических мембран, окруженные мелкодисперсными частицами. В наружном слое преобладают живые микроорганизмы, находящиеся в состоянии активного роста. Клетки

формируют микроколонии – группы клеток одного типа. Встречаются бациллы, нитчатых форм не выявлено. Большая часть клеток погружена во внеклеточный матрикс. Важно подчеркнуть, что и во внешнем, живом, слое отмечено присутствие некоторого количества мелкодисперсных частиц, которые сорбированы гранулами из сточной воды.

Установлен ряд факторов, влияющих на формирование гранул активного ила:

– добавление гранулированного активированного угля;

– уровень аэрации;

– присутствие в среде микроэлементов, таких как железо, кобальт, никель и марганец;

– концентрация субстрата, голодание после пиковой нагрузки;

– значение pH;

– наличие уже сформированных гранул;

– внесение пероксида водорода, вызывающего состояние оксидативного стресса;

– гидродинамический режим в реакторе и др.

1.2.3. Стадии формирования аэробного гранулированного активного ила

Наблюдения показали, что гранулы в своем развитии проходят ряд стадий:

1) свободная биомасса в среде агрегирует в хлопья ила. Кроме того, часть ила адгезируется на стенках колбы образованием биопленки. Продолжительность стадии зависит от уровня ХПК, степени аэрации, частоты обновления среды со сливом части надосадочной жидкости (при этом, очевидно, часть несфлокулированного и неосевшего ила удаляется из среды) и составляет от 1 до 3 недель;

2) хлопья принимают округлую форму и уплотняются, образуя первые гранулы. Интенсивность зарастания стенок колбы снижается;

3) гранулы укрупняются и равномерно чернеют;

4) крупные гранулы распадаются на части. Начало этой стадии может спровоцировать резкое изменение ХПК среды, pH, степени аэрации. В среднем стадия наступает через 50–100 сут с момента образования первых гранул.

Цвет гранул зависит от условий, в которых существует гранула. Микроскопирование препаратов микроорганизмов из гранул

показало, что микроорганизмы, составляющие гранулы в разные периоды развития, различны. Гранулы на первой стадии развития образованы большей частью грибными культурами. Эти гранулы малоустойчивы и разрушаются в течение нескольких дней из-за лизиса содержимого во внутренней части гранул. Однако в ходе развития грибных гранул-колоний к ним присоединяются и на них закрепляются бактериальные колонии. Таким образом, гранула – это реактор, в котором взаимодействуют гетеротрофные бактерии, грибные культуры и, вероятно, бактерии-нитрификаторы и денитрификаторы, что подтверждается рассевами на агаризованные селективные среды.

1.3. Очистка хозяйственно-бытовых сточных вод с использованием реакторов циклического действия

Принцип работы SBR-реакторов (Sequencing Batch Reactor) известен примерно с 20-х гг. прошлого века, однако только в последнее время происходит их повсеместное распространение и значительное расширение сферы использования. Такие сооружения особенно успешно работают в системах, характеризующихся периодическими низкими расходами сточных вод в отдельные периоды либо резкими изменениями режима поступления сточных вод на очистные сооружения. Системы очистки с реакторами циклического действия оказались востребованными для обработки как хозяйственно-бытовых, так и производственных сточных вод.

С появлением эффективного аэрационного оборудования, устройств для перемешивания иловой смеси и компьютерных систем управления SBR-реакторы во многих случаях становятся более предпочтительными в сравнении с традиционными сооружениями биологической очистки с активным илом.

Преимущества таких очистных систем проявляются при недостатке площади для размещения сооружений, когда за счет обработки воды только в одной технологической емкости резко уменьшается потребность в площади для размещения очистных сооружений. Кроме того, при использовании процесса декантации (отведения осветленной воды из слоя над уровнем активного ила)

после обработки воды на таких сооружениях может достигаться остаточное содержание взвешенных веществ менее 10 мг/дм^3, что устраняет необходимость применения дополнительных сооружений, таких как вторичные отстойники, для разделения иловой смеси и очищенных сточных вод.

При биологической очистке сточных вод с использованием реакторов периодического действия предусматривается предварительная очистка сточных вод от механических примесей на решетках и песколовках.

Количество параллельно работающих реакторов и необходимость включения в состав очистных сооружений приемных резервуаров-накопителей для сточных вод перед биологической очисткой и резервуаров-накопителей для очищенных вод зависят от неравномерности поступления сточных вод на очистку и условий отведения очищенных сточных вод.

Каждый резервуар в системе очистки с SBR-реакторами заполняется в течение определенного периода времени и затем используется как порционный реактор. После обработки иловая смесь разделяется путем осаждения активного ила и осветления очищенных сточных вод, образующихся над уровнем оседающего ила. После стадии осаждения производится декантирование очищенных сточных вод из слоя осветленной воды, образующейся при оседании флоккул активного ила, а также удаление избыточного активного ила. После выдерживания активного ила в резервуаре на протяжении некоторого времени цикл обработки может начинаться снова.

Продолжительность каждой фазы обработки определяется исходя из цели очистки и параметров активного ила.

Цикл обработки может быть задан таким образом, чтобы создавались аэробные, анаэробные и аноксидные условия для биологического удаления биогенных веществ, включая нитрификацию, денитрификацию с достижением концентраций общего азота менее 5 мг/дм^3, а также для частичного удаления соединений фосфора. С целью более глубокого удаления фосфора из сточных вод может использоваться химическое осаждение за счет дозирования химических реагентов.

При применении реакторов последовательного действия для биологической очистки сточных вод с нитрификацией и денитрификацией периоды перемешивания в аноксидных условиях

и периоды аэрации могут назначаться с учетом требуемой степени удаления азота.

При продолжительном наполнении предусматриваются два и более периода перемешивания в аноксидных условиях и периоды аэрации, которые производятся последовательно. Режим очистки в данном случае близок к режиму параллельной денитрификации в проточных сооружениях.

При наличии двух и более реакторов на очистных сооружениях периоды их наполнения могут чередоваться. Начало заполнения реактора сточными водами совмещается с начальным моментом фазы денитрификации, а период нитрификации прерывается периодом денитрификации, в течение которого удаляется нитрат, образованный за период денитрификации. Режим очистки в данном случае близок к режиму чередующейся денитрификации в проточных сооружениях.

При залповом наполнении реактора процесс очистки близок к режиму предварительной денитрификации в проточных очистных сооружениях. Заполнение реакторов осуществляется в период денитрификации, после окончания которого назначается период аэрации. При необходимости отключается аэрация и производятся дополнительные периоды перемешивания в аноксидных условиях для денитрификации. Если при залповом наполнении реактора до максимального уровня не достигается достаточная степень денитрификации, может предусматриваться несколько периодов залпового заполнения. При этом в течение первого периода подачи исходных сточных вод в реактор осуществляется заполнение части его рабочего объема. Подача производится в аноксидных условиях, режим наполнения и обработка назначаются таким образом, чтобы после последнего периода наполнения имелось достаточно времени на проведение нитрификации.

Для повышения степени очистки сточных вод после SBR-реакторов может применяться фильтрование на песчаных фильтрах или фильтрах других конструкций.

Аэрация иловой смеси в SBR-реакторах может производиться как поверхностными механическими аэраторами, так и с использованием пневматических аэраторов различных типов. При этом в ряде случаев при применении механических аэраторов перемешивание в аноксидных и анаэробных условиях осуществляется путем погружения аэраторов в слой иловой смеси. При работе аэраторов

в погруженном состоянии поступление воздуха в иловую смесь минимизируется и аэратор работает только для перемешивания содержимого реактора. При использовании пневматической аэрации SBR-реакторы дополнительно оснащаются погружными мешалками, которые обеспечивают перемешивание при отключении аэраторов.

Особенностью эксплуатации погружных мешалок в таких реакторах является цикличность действия, а также их работа при переменном наполнении. Мешалки отключаются при работе аэрационных систем и во время осаждения ила и отведения очищенной воды из реакторов. Кроме того, процесс очистки может производиться при одновременном наполнении реактора, что изменяет нагрузку на перемешивающие устройства. При размещении мешалок следует учитывать влияние на процесс перемешивания различного оборудования, смонтированного внутри реакторов (декантеры, аэрационные системы).

Еще одна задача, которая решается при эксплуатации реакторов последовательного действия, – декантация, или отведение очищенной воды. При отключении перемешивающих устройств и аэраторов через 10–15 мин начинается процесс осаждения активного ила и в верхней части реактора образуется слой очищенной воды, свободный от активного ила, толщина которого с течением времени увеличивается. Требуется за относительно короткий период времени отвести очищенные воды из образовавшегося слоя осветленной жидкости таким образом, чтобы предотвратить попадание частиц ила в поток отводимой жидкости. При преждевременном начале декантации существует опасность захвата и выноса с очищенными водами значительного количества активного ила при неблагоприятных условиях седиментации. С другой стороны, более позднее включение декантации гарантирует стабильность параметров очищенных вод при любых условиях седиментации. Однако второй случай режима декантации увеличивает продолжительность цикла обработки. В связи с этим длительность отдельных фаз обработки устанавливается на основании детального анализа параметров обрабатываемой воды, свойств активного ила и других данных.

При декантации очищенные сточные воды должны забираться из слоя над осевшим активным илом без его захвата и взмучивания. Одним из технических решений, обеспечивающих такой режим,

является применение погружных насосов, смонтированных вместе с водосливами и перемещающихся по полости реактора при изменении уровня жидкости в нем. В данном случае насос в таком устройстве устанавливается в «перевернутом» виде в сравнении с его монтажом на канализационных насосных станциях. При снижении уровня жидкости в сооружении такое устройство перемещается вниз, находясь в слое осветленных сточных вод, а насос в нем постоянно пребывает в жидкости, что обеспечивает охлаждение электродвигателя и не требует применения встроенных систем охлаждения.

Кроме насосных систем декантации существуют и альтернативные варианты устройств для отведения воды, которые основаны на использовании сифонов, водоприемников с принудительным погружением, понтонных (плавающих) систем. Принцип работы плавающих декантеров заключается в заборе очищенных сточных вод через водоприемное устройство. При максимальном уровне воды в реакторе водоприемные устройства открыты полностью и вода с постоянным расходом поступает в отводящий трубопровод. По мере снижения уровня воды в реакторе происходит и одновременное перемещение заборного устройства декантера, при котором сохраняется постоянный уровень воды над водоприемником, что обеспечивает одинаковый расход при его перемещении, и таким образом предотвращается турбулизация потока жидкости. При достижении минимального уровня водоприемное устройство закрывается, прекращая отвод воды из реактора.

Удаление избыточного активного ила из реакторов может осуществляться обычными канализационными насосами. Так, доза ила после окончания фазы осаждения не превышает значений концентраций примесей, допустимых для перекачки насосами с канальными рабочими колесами (10–12%).

Использование таких реакторов в системах водоотведения Республики Беларусь может помочь в решении ряда задач по достижению требуемой степени очистки сточных вод в тех случаях, когда строительство сооружений проточного типа слишком затратное или режим поступления сточных вод делает их эксплуатацию проблемной. При наличии на очистных станциях емкостных сооружений, которые нуждаются в реконструкции и могут быть переоборудованы под SBR-реакторы, применение такой технологии может характеризоваться высокой экономичностью.

Основная особенность технологии периодической биологической очистки в реакторах SBR состоит в том, что все биохимические процессы (полного окисления органики, нитри- и денитрификации, биологического и химического удаления фосфора), а также вспомогательные процессы загрузки, отстаивания, выгрузки (декантации) очищенных вод осуществляются в одном резервуаре. Эта технология позволяет принимать стоки с высоким коэффициентом неравномерности поступления и практически не зависит от качества поступающей воды. Использование технологии SBR позволяет легко регулировать и при необходимости быстро изменять время пребывания очищаемой воды в биореакторе, концентрацию активного ила, нагрузку на ил, его возраст, концентрацию растворенного кислорода, время отстаивания, загрузки и выгрузки. Все технологические операции в биореакторе могут либо осуществляться по заданной временной программе, либо проводиться по показаниям датчика концентрации кислорода, т. е. по потреблению кислорода.

Вторая особенность технологии SBR – сохранение осевшего активного ила в биореакторе после завершения периода очистки сточных вод. Путем отбора или удержания в биореакторе избыточного ила выполняется коррекция концентрации активного ила при каждой новой порции очищаемого стока. Таким образом, регулируется рабочая концентрация активного ила, его возраст и нагрузка на ил в необходимых пределах, соответствующих изменению состава или концентрации загрязняющих веществ в сточных водах.

Третья особенность технологии SBR – автономная система аэрации иловой смеси в биореакторе. Аэрация осуществляется механическими турбоаэраторами на плавающей платформе или донными гиперболическими мешалками с подачей воздуха от индивидуального компрессора. Благодаря приводу с частотными преобразователями частота вращения турбин или мешалок может изменяться в широких пределах.

Четвертая особенность технологии SBR – циклический график подачи воздуха в биореактор с чередующимися периодами интенсивного насыщения иловой смеси кислородом воздуха (биоокисление органики и нитрификация) и периодами медленного перемешивания без подачи кислорода (денитрификация, биологическая дефосфатация). В зависимости от концентрации загрязняющих

веществ в сточных водах график аэрирования иловой смеси может быть быстро изменен.

Благодаря вышеназванным особенностям периодический процесс биологической очистки практически независим от значительных колебаний объемов сточных вод, поступающих на очистку, состава и концентраций загрязняющих веществ. Это главное преимущество периодического процесса биологической очистки в сравнении с процессами, осуществляемыми непрерывно в аэротенках или биореакторах с подвижными или неподвижными загрузочными материалами и прикрепленной к ним биомассой.

Значительно сокращается площадь застройки и количество насосного оборудования (отсутствие насосов для перекачки рециркуляционного активного ила).

В технологической схеме с двумя и более реакторами во время низких нагрузок возможно отключение одного из реакторов. При этом активность ила отключенного реактора сохраняется при условии его постоянной аэрации (эффект регенерации активного ила). Отключение одного или нескольких реакторов SBR возможно, например, во время зимних месяцев (при оттоке жителей в туристических регионах) или летних месяцев (когда биологические процессы ускорены из-за повышенной температуры сточной воды).

Следующим преимуществом является обеспечение в SBR-реакторе условий абсолютного перемешивания, которых из-за недостаточной аэрационной диффузии невозможно достигнуть в реакторе проточного типа.

В SBR «быстрого наполнения» концентрация субстрата в начале цикла значительно выше концентраций в конце цикла, в результате данных перепадов повышается активность ила, а также его стойкость к залповым спускам. Следующим позитивным моментом резкого изменения концентраций субстрата в реакторе считается погашение роста нитчатых бактерий и, как следствие, снижение илового индекса и улучшение процесса седиментации.

Изменение седиментационных свойств активного ила является причиной многих проблем на очистных сооружениях, предназначенных для удаления биогенных элементов. Изменения в нагрузке на активный ил в течение одного цикла стимулируют рост микроорганизмов, способных к образованию хлопьев активного

ила, и предотвращают развитие нитчатых бактерий, являющихся причиной плохой седиментации ила и его выноса из реактора.

Более того, в SBR-реакторах процесс седиментации осуществляется в идеальных гидравлических условиях, так как во время осаждения, а также декантирования очищенной воды отсутствует приток сточной воды и связанная с этим процессом турбулентность. При повышении илового индекса существует возможность продления фазы седиментации и предотвращения выноса активного ила из системы.

Повышение гидравлической нагрузки на реактор проточного типа часто сопровождается скоплением активного ила во вторичном отстойнике, данное явление не находит место в SBR, таким образом, весь активный ил системы участвует в процессах очистки.

Простота конструкции SBR позволяет изготавливать реакторы в виде стандартизированных модулей, что ускоряет процесс расширения очистных сооружений без больших финансовых затрат.

При всех перечисленных преимуществах стоит отметить, что эффективность работы SBR в большой степени зависит от надежности автоматических систем управления.

Увеличение объема притока сточных вод в реактор проточного типа ведет к одновременному повышению объема сброса. Для регулирования расхода сточных вод при SBR-технологии необходимо предусматривать усреднители или регулирующие емкости.

К недостаткам также относится сложная система аэрации, эксплуатируемая в циклическом режиме.

Изменяющийся уровень воды и давление на стенки резервуара также являются недостатками циклического реактора.

Кроме того, возможна дополнительная нагрузка на водоем, принимающий очищенную сточную воду, возникающая в результате несинхронизированного отвода очищенных сточных вод из отдельных SBR. Предотвращение неравномерного сброса возможно при устройстве накопительного резервуара для очищенных сточных вод.

Важная отличительная особенность биореакторов SBR состоит в том, что в одном и том же типе биореактора можно осуществлять процесс очистки стоков с разными рабочими циклами: 9, 12, 15, 18, 21 или 24 ч в зависимости от степени загрязненности стоков и степени окисляемости загрязнений.

Работа биореактора состоит из последовательных фаз: наполнение, аэрация, перемешивание, отстаивание, декантация и отбор избыточного гранулированного активного ила.

Наполнение и перемешивание. Сточные воды поступают в SBR-реактор и перемешиваются с активным илом (при небольшой скорости турбины или мешалки) в анаэробных условиях. Эта фаза очень существенна для систем с большим содержанием органических загрязнений. На данной фазе производится контроль качества активного ила.

Скорость подачи сточных вод не имеет значения, можно организовать их подачу очень быстро из усреднителя, а могут подаваться сточные воды постепенно по мере их поступления.

Подача сточных вод продолжается в условиях перемешивания и аэрации (при большой скорости турбины или одновременной работе мешалки и воздуходувки).

Аэрация может быть прекращена (низкая скорость турбины и отключение воздуходувки). Чередование аэробных и анаэробных условий обусловливает протекание процессов нитрификации, денитрификации и биологической дефосфотации. Изменение скорости турбины (или мешалки) производится автоматически в зависимости от сигнала датчика кислорода.

Аэрация (нитрификация). Когда биореактор наполнился, подача воды прекращается. Вновь поступающие сточные воды подаются или в следующий биореактор, или в усреднитель-накопитель. Циклы перемешивания и аэрации продолжаются до полного прекращения потребления кислорода илом. Это означает, что ил окислил все органические загрязнения, поступившие в биореактор. Прерывистая работа турбоаэратора приводит к значительной экономии энергии.

При достаточном возрасте активного ила и благоприятных условиях автотрофными бактериями осуществляется процесс нитрификации.

Перемешивание. Во время этой фазы подача воздуха прекращается и начинается перемешивание активного ила. В SBR-реакторе с удалением биогенных элементов во время процесса перемешивания может протекать денитрификация – процесс восстановления нитратов до газообразного азота. Важными условиями процесса денитрификации являются отсутствие растворенного кислорода и наличие легкоокисляемых органических веществ в реакторе.

Глубокое удаление фосфора достигается методом биологической дефосфотации, т. е. предварительной подготовкой бактерий

в анаэробных условиях к повышенному потреблению и накоплению фосфора в последующей аэробной стадии. Технологии удаления общего фосфора основаны на совместном удалении всех форм фосфора. Важным условием для успешного протекания процесса является чередование аэробных и строго анаэробных условий.

Седиментация. После отключения аэрации и перемешивания начинается седиментация активного ила. Скорость и продолжительность седиментации зависят от величины илового индекса, характеризующего скорость осаждения активного ила.

Декантация. Перемешивание отсутствует. Декантор забирает чистую воду из верхнего слоя отстоянной воды и выводит ее из биореактора.

Отбор избыточного ила. Избыточный активный ил выводится из системы и подается на ленточный фильтр-пресс. SBR-реактор готов к приему следующей порции сточных вод.

1.4. Использование иммобилизации биомассы активного ила в практике очистки сточных вод

1.4.1. Преимущества использования биотенков

Аэротенки с насадкой – биотенки – получили широкое распространение в практике очистки сточных вод. Насадка позволяет увеличить концентрацию ила в биотенках за счет закрепления микроорганизмов на ней. С повышением концентрации ила возрастает пропускная способность биотенка, которая в обычных условиях лимитируется работой вторичных отстойников, не способных разделить иловые смеси при концентрации свыше 4–6 г/дм^3.

Разновидностью биотенков являются аэротенки, оборудованные роторными биофильтрами, в которых значительная часть активного ила закрепляется на поверхности насадки, размещенной во вращающемся полупогруженном барабане ротора. Насадка роторов может выполняться в виде блоков из листов гофрированной пластмассы, насыпной загрузки из пластмассовых колец или рулонов из пластмассовых сеток, а также из металлических и пластмассовых дисков и т. п. Оборудование биотенков роторными биофильтрами позволяет существенно (в 1,5–2 раза) повысить их пропускную

способность без увеличения размеров вторичных отстойников и снизить производительность воздуходувных станций, поскольку в них осуществляется непосредственный контакт вращающейся загрузки с атмосферным воздухом.

Повышенная концентрация биомассы активного ила в биотенке обеспечивает их устойчивость к высоким концентрациям загрязнений в поступающих сточных водах. Биотенки целесообразно применять при резких колебаниях состава поступающих сточных вод или залповых сбросах. Эти сооружения используют для очистки сточных вод производств, состав которых обусловливает развитие в активном иле нитчатых микроорганизмов.

Работа биотенков, как и обычных аэротенков, может осуществляться в режимах неполной и полной биологической очистки, с отдельной регенерацией ила или без нее, в режиме продленной аэрации с окислением избыточного активного ила. В биотенки могут быть переоборудованы существующие аэротенки путем установки в них загрузочных блоков или кассет.

В последние годы в системах доочистки сточных вод стали широко применяться новые методы, которые сочетают в себе достоинства фильтров и предусматривают возможность биологической деструкции остаточных органических загрязнений после полной биологической очистки сточных вод при помощи прикрепленной биомассы. В качестве загрузочного материала, на котором происходят процессы глубокого изъятия загрязнений, используются полимерные элементы типа «Контур», «Водоросль» и др. В практике очистки сточных вод такие сооружения получили наименование биореакторов доочистки.

Скорость фильтрации в биореакторах доочистки принимается в диапазоне от 5 до 7 $м^3$/ч при времени обработки сточных вод 0,5–1,0 ч. Достигается снижение содержания взвешенных веществ и органических загрязнений по БПК с 15–50 до 1–5 мг/$дм^3$.

В зависимости от степени глубокой очистки биореакторы могут быть установлены в одну или несколько ступеней.

Следует отметить, что применение аэротенков с фиксированной микробиотой наиболее целесообразно для проведения биологической очистки в режиме глубокого удаления биогенных элементов.

Аэротенки, работающие в окислительном режиме, выполняют две основные функции: окисление биоразлагаемых органических веществ до углекислого газа и воды и окисление относительно

токсичных соединений аммонийного азота до менее токсичного нитратного азота. Для эффективного окисления органических веществ желательно поддерживать небольшой средний возраст ила (5–7 сут), тогда как для окисления аммонийного азота возраст ила необходимо увеличивать до 12–14 сут. Возраст активного ила на носителях больше, чем у ила во взвешенном состоянии, непрерывно удаляемом и обновляемом. На практике выбирают обычно компромиссное решение, для чего к свободноплавающему илу добавляют специальную загрузку с развитой поверхностью. Такая технология позволяет в пределах одной очистной системы выращивать активный ил разных типов и проводить процесс в непрерывном режиме.

1.4.2. Роль иммобилизованных биосистем в подавлении нитчатого вспухания активного ила

Известные методы борьбы со вспуханием активного ила в аэротенках классической конструкции сводятся в основном к подавлению деятельности нитчатых организмов. Введение в аэротенки загрузочных материалов позволяет закрепить на поверхности этих носителей нитчатые бактерии активного ила, обладающие хорошей способностью прикрепляться к различным поверхностям и высокой окислительной способностью. Таким образом, эти бактерии не попадают с иловой смесью во вторичные отстойники, что обеспечивает более надежную работу очистных сооружений.

В системах, оснащенных носителями, за счет возрастания концентрации ила и общей биомассы происходит снижение нагрузок на ил, что также является одним из факторов, приводящих к подавлению нитчатого бактериального вспухания и улучшению качества очистки.

В связи с этим биотенки рекомендуется использовать для биологической очистки производственных сточных вод, для которых характерно образование активного ила с интенсивным развитием нитчатых бактерий и высоким иловым индексом (например, сточные воды молокоперерабатывающей промышленности).

1.4.3. Технологические особенности применения носителей на очистных сооружениях

Рекомендуемый суммарный объем носителей должен составлять от 5 до 15% от общего объема аэротенков. Это позволяет обеспечить подавление нитчатого вспухания, максимальную

окислительную мощность системы, высокую скорость нитрификации. В то же время указанный объем носителей предупреждает падение удельных скоростей окисления, угнетение метаболизма организмов активного ила, находящегося во взвешенном состоянии, за счет избыточной массы биопленки.

По данным отечественных и зарубежных исследователей, количество наполнителя может быть большим, но не должно превышать 30% от общего объема аэрационной части.

В процессе очистки происходит самопроизвольное образование биопленки на поверхности носителя. При использовании плавающих носителей отмечается периодическое фрагментарное отделение отмерших частиц и их вынос в зону отстаивания, т. е. система регенерации является саморегулирующейся.

При применении в качестве насадки насыпных и волокнистых материалов необходимо предусматривать их периодическую регенерацию от чрезмерного накопления биомассы путем интенсивной аэрации. Например, при заиливании загрузочного материала в биореакторах доочистки их отмывают подачей воздуха через аэрационную систему. Водовоздушный поток внутри контейнеров срывает иловые отложения с загрузки, в это время осуществляют опорожнение биореактора, и ил выводится из сооружения. На период промывки биореактора подача сточной жидкости на доочистку прекращается.

Отмечено отсутствие заиливания ершовой загрузки в зонах денитрификации, так как денитрифицирующие бактерии прикрепленного биоценоза выделяют молекулярный азот. Пузырьки газа взрыхляют биомассу и способствуют ее отделению от носителя.

В аэрируемых зонах с целью регенерации блоки с носителями устанавливают непосредственно над аэраторами.

При изготовлении ряда носителей следует предусматривать их защиту от засорения. Если этого не обеспечивать, в процессе эксплуатации они быстро засоряются плавающими отбросами, которые загнивают, и качество очищенных сточных вод ухудшается. Очистка носителей биомассы промыванием струей воды – трудоемкая процедура, а если она предусмотрена непосредственно в аэротенках, это требует их опорожнения. Носители биомассы ершового типа можно защищать от засорения синтетической рыболовной сетью с малым размером ячеи, что позволяет эксплуатировать их без периодической очистки от накопившегося мусора.

Применение носителей биомассы имеет свои ограничения. Так, например, их нельзя использовать при очистке сточных вод с повышенным содержанием нефтепродуктов и жиров (сточные воды нефтеперерабатывающих, маргариновых, молочных заводов и т. п.). Масляные продукты обволакивают материал носителей и быстро выводят их из строя.

При неудовлетворительной аммонификации белковых соединений в системе канализации и высоком содержании белка в сточных водах, поступающих на очистку, этот процесс будет обеспечиваться в анаэробных зонах на носителях, результатом чего будет являться увеличение содержания аммонийного азота в очищенных сточных водах.

1.5. Мембранные методы

При строительстве новых и реконструкции уже существующих очистных сооружений предлагается ряд принципиально новых решений, самым технически доступным из которых на сегодняшний день является мембранный биореактор (МБР). Использование МБР позволяет повысить эффективность и надежность функционирования очистных сооружений, увеличить их производительность, сократить занимаемые площади, снизить объем избыточного активного ила.

Основным отличием мембранного биореактора от систем традиционной биологической очистки в аэротенках является наличие мембранного модуля, который предназначен для разделения иловой смеси и представляет собой альтернативу широко применяемому методу осаждения активного ила во вторичных отстойниках.

Мембранные модули производят на базе микро- и ультрафильтрационных мембран, что определяет их избирательную проницаемость по отношению к компонентам разделяемой смеси. Четкой границы, разделяющей процессы микро- и ультрафильтрации, нет. Считают, что микрофильтрационные мембраны способны задерживать взвешенные вещества, коллоидные соединения, бактерии, некоторые макромолекулы (например, гуминовые кислоты). Ультрафильтрационные мембраны обеспечивают селективное концентрирование частиц размером более $5 \cdot 10^{-3}$ мкм, т. е.

вирусов, органических молекул (например, белков) и ионов. Мембраны изготавливают из различных материалов (поливинилиденфторид, полиамид, полиакрилонитрил, фторопласт и др.).

В процессах биологической очистки сточных вод получили распространение мембранные модули с плоскими элементами, которые просты и удобны в эксплуатации. Однако плоские элементы имеют небольшую удельную поверхность (110–240 $м^2/м^3$) и, следовательно, невысокую производительность (15–25 $дм^3/(м^2 \cdot ч)$). Наиболее широко используются высокопроизводительные установки с полыми волокнами, удельная поверхность фильтрования которых варьирует в пределах 260–1100 $м^2/м^3$. Пропускная способность их составляет от 20 до 100 $дм^3/(м^2 \cdot ч)$.

Мембранный биореактор представляет собой емкостное сооружение, оборудованное определенным количеством мембранных модулей, от которых зависит его производительность. В погружных МБР мембранный модуль погружен непосредственно в иловую смесь и устанавливается в биореакторе или в отдельном резервуаре. Модуль включает 10–20 кассет с мембранами. В каждой кассете располагаются от 5 до 15 пучков, состоящих из 100–1000 мембранных волокон и оборудованных общим патрубком отвода фильтрата. Мембранное волокно представляет собой полую нить длиной до 2,0–2,5 м с наружным диаметром 2,0–2,5 мм и внутренним диаметром около 1,5 мм.

Движущей силой процесса ультрафильтрации является градиент давлений, который составляет около 0,2–0,3 МПа. Во внутренней полости мембранного волокна с помощью вакуумного или самовсасывающего насоса создается отрицательное давление (разрежение). В результате разницы давлений на внешней и внутренней поверхности волокна происходит всасывание иловой смеси внутрь волокна. Далее фильтрат отводится по внутренней поверхности мембранного волокна и поступает во всасывающий трубопровод насоса, создающего отрицательное давление.

Существенным недостатком мембран является невысокая водопроницаемость, что в значительной степени связано с явлением «концентрационной поляризации» мембран, сущность которого заключается в формировании примембранного слоя молекул и ионов, тормозящего транспорт через мембрану низкомолекулярных соединений. Негативный эффект явления «концентрационной поляризации» мембран минимизируют созданием непрерывного

турбулизованного протока жидкости около поверхности мембран. Для этого в МБР внутри каждого пучка волокон установлен крупнопузырчатый аэратор. Пузырьки воздуха, подаваемые аэратором, создают восходящий водовоздушный поток, который обеспечивает сбивание отложений активного ила и отвод их с внешней поверхности волокон. Кроме того, с помощью системы аэрации, встроенной в мембранный модуль, активный ил в мембранном резервуаре поддерживается во взвешенном состоянии, а иловая смесь насыщается кислородом, что создает благоприятные условия для биологической очистки.

Опыт эксплуатации МБР подтверждает их высокую эффективность. Технология позволяет решить ряд проблем в отношении эксплуатационных характеристик установки, физиологического состояния активного ила, а также качества очистки сточных вод по некоторым показателям.

Решение проблемы выноса активного ила с очищенными сточными водами. Поры ультрафильтрационных мембран имеют меньший размер, чем размеры клеток микроорганизмов. Таким образом, мембрана является физическим барьером на пути проникновения организмов активного ила в водные объекты с очищенными сточными водами. В МБР видовой состав, размер и форма хлопков активного ила не оказывают влияния на эффективность илоотделения. Отсутствует проблема «вспухания» ила, так как размер нитчатых микроорганизмов более чем в 5 раз больше размера пор ультрафильтрационных мембран. МБР обеспечивает практически полное удаление взвешенных веществ, их концентрация в очищенной воде не превышает 1 мг/дм^3.

Предотвращение выноса биогенных элементов со взвешенными веществами. Мембранное разделение иловой смеси позволяет избежать выноса азота и фосфора в составе дисперсных хлопьев активного ила, что имеет место в схемах с вторичными отстойниками.

Изменение подхода к эксплуатации сооружений биологической очистки. Эксплуатация аэротенков и вторичных отстойников основывается на селекции компактных, хорошо оседающих хлопьев активного ила. Отказ от селекции крупных хлопьев активного ила за счет замены самого механизма разделения иловой смеси в МБР позволяет эксплуатировать эти сооружения с параметрами, значение которых находится вне диапазона нормальных режимов эксплуатации традиционных конструкций аэротенков.

Эффективная очистка за счет большой площади контакта микроорганизмов со сточными водами. Размер хлопьев активного ила в МБР в 5–10 раз меньше, а концентрация нитчатых микроорганизмов в 5–10 раз выше, чем в аэротенках с последующим вторичным осаждением. За счет дисперсности активного ила многократно увеличивается площадь контакта микроорганизмов активного ила со сточными водами, что приводит к эффективной сорбции тяжелых металлов, трудноокисляемых и инертных органических веществ.

Высокая окислительная мощность при малых объемах биореактора. Отказ от гравитационного метода разделения иловой смеси позволяет повысить концентрацию активного ила в биореакторе до 10–20 г/дм^3 (в обычном аэротенке – 2–4 г/дм^3), что при равенстве объемов с традиционными конструкциями аэротенков предоставляет возможность производить очистку высококонцентрированных сточных вод с содержанием органических веществ по ХПК до 4–5 г/дм^3. Одновременно высокие дозы ила позволяют сократить время пребывания сточных вод в сооружении, а следовательно, уменьшить объем биореактора в 2–3 раза. Как следствие, площадь, занимаемая МБР, в 2–4 раза меньше площади, занимаемой традиционными сооружениями биологической очистки.

Сокращение количества избыточного активного ила. При переходе от гравитационного метода разделения иловой смеси к мембранной фильтрации наблюдаются глубокие изменения в структуре биоценоза активного ила. В традиционных очистных сооружениях возраст ила не может превышать 15 сут, поскольку при дальнейшем его увеличении ухудшаются седиментационные свойства хлопков, и отмечается вынос ила из вторичных отстойников. Возраст ила в МБР составляет от 20–30 сут при очистке хозяйственно-бытовых и городских сточных вод до 100 сут и более при очистке высококонцентрированных сточных вод. Верхний предел возраста ила зависит от эффективности гидролиза отмершей клеточной массы и допустимой массы инертных взвешенных веществ в мембранном биореакторе. Несмотря на наличие нитчатых микроорганизмов, за счет повышенной минерализации активный ил обладает удовлетворительными водоотдающими свойствами и поступает на обработку непосредственно из биореактора. Преобладание медленнорастущей микробиоты позволяет значи-

тельно снизить прирост ила (так как возраст ила обратно пропорционален массе избыточного ила), и в МБР на 30–40% сокращается объем осадка, а значит, и расходы на обезвоживание избыточного активного ила и его утилизацию.

Эффективная нитрификация сточных вод. Эксплуатация в условиях повышенного возраста активного ила приводит к селекции медленнорастущей микробиоты, которая наиболее эффективно разлагает трудноокисляемые органические вещества, обеспечивает процессы нитрификации сточных вод. Добиться высоких показателей в биологической очистке от соединений азота и фосфора позволяет чередование анаэробных (бескислородных) и аноксидных (бескислородных с наличием ионов нитратов) зон в МБР.

Обеззараживание сточных вод. Эквивалентный диаметр пор микрофильтрационных мембран находится в пределах 0,1–8,0 мкм, ультрафильтрационных – 0,01–0,10 мкм. Вследствие того, что поры мембран имеют меньший размер, чем размеры некоторых вирусов и клеток подавляющего большинства известных бактерий, а также за счет образования отложений на поверхности мембраны, выступающих как дополнительный фильтрующий слой, в МБР происходит частичное обеззараживание сточных вод. Эффективность задержания бактерий составляет около 99,999%, вирусов – 99,9%. Таким образом, непосредственно после МБР очищенная вода может быть сразу направлена на повторное использование для непитьевых целей.

Устойчивость процесса очистки к колебаниям концентраций загрязняющих веществ и залповым сбросам. Высокие концентрации активного ила позволяют эксплуатировать биореактор в режиме низких нагрузок на активный ил (до 0,2 кг БПК/(кг · сут)), что создает резерв окисляющей способности и повышает устойчивость биоценоза активного ила к колебанию состава сточных вод. Использование мембранного метода разделения иловой смеси, эффективность которого не зависит от физиологического состояния активного ила, обеспечивает высокую степень очистки при залповых сбросах загрязняющих веществ и ксенобиотиков, негативно влияющих на физиологическое состояние микроорганизмов активного ила.

Вклад мембраны в удаление загрязняющих веществ. За счет образования динамического слоя отложений на поверхности мембраны и в ее порах происходит физическое удаление значительного количества макромолекул, коллоидных веществ. Вклад мембраны

в общую эффективность удаления органических веществ в мембранных биореакторах составляет от 10 до 20%.

В процессе фильтрации в порах и на поверхности мембран образуются биологические и минеральные отложения. Для эффективной борьбы с отложениями современная практика эксплуатации погружных мембранных биореакторов предполагает использование четырех методов:

– периодическая или постоянная аэрация наружной поверхности половолоконных и плоских мембран;

– обратная промывка фильтратом;

– периодическая обратная промывка слабоконцентрированными растворами реагентов (обычно гипохлорит натрия или слабая органическая кислота);

– погружение мембранных модулей в слабоконцентрированный раствор гипохлорита натрия на 12–30 ч.

Срок службы мембран составляет 8–12 лет.

Повышенный интерес к технологии МБР в последние годы обусловлен значительным снижением стоимости данной технологии. По капитальным затратам технология практически сравнялась с затратами на строительство системы «аэротенк – вторичный отстойник – сооружения доочистки», при этом обеспечивается надежность в эксплуатации, возможность полной автоматизации и более высокая эффективность очистки.

Применяются мембранные биореакторы при очистке сточных вод текстильного производства, молокозаводов и маслосырзаводов, птицефабрик и других предприятий, а также при очистке поверхностных сточных вод. В зависимости от типа мембранных модулей производительность очистных сооружений предприятий может составлять от 25 до нескольких тысяч $м^3$/сут, городских очистных сооружений – от 1000 до сотен тысяч $м^3$/сут.

Промышленные мембранные установки должны соответствовать следующим требованиям, которые необходимо учитывать на стадии проектирования:

1) большая рабочая поверхность мембран на единицу объема установки;

2) простота монтажа и обслуживания системы;

3) обеспечение равномерного распределения жидкости по мембранным элементам с достаточно высокой скоростью течения для уменьшения воздействия концентрационной поляризации;

4) создание условий для минимального перепада давления в установке;

5) герметичность, коррозионная стойкость и достаточный запас механической прочности для работы при повышенных давлениях и с агрессивными химическими средами.

1.6. Лабораторная работа. Очистка сточных вод в аэробных условиях

Вопросы для самоподготовки. 1. Характеристика и классификация сточных вод. 2. Способы очистки сточных вод. 3. Преимущества и недостатки биологического способа очистки. 4. Закономерности очистки сточных вод в аэробных условиях. 5. Факторы, влияющие на аэробную очистку сточных вод.

Цель работы – практическое знакомство с аэробным процессом очистки сточных вод; усвоение методов определения перманганатной окисляемости, биологического потребления кислорода (БПК), содержания фосфора фосфатного и общего в исходных и биологически очищенных водах.

Порядок выполнения работы. Установить перманганатную окисляемость и БПК исходных сточных вод. Определить содержание фосфора фосфатного и общего. Подготовить сточные воды и провести биологическую очистку в аэробных условиях. Определить перманганатную окисляемость, БПК, содержание фосфора фосфатного и общего в биологически очищенных водах.

1.6.1. Определение перманганатной окисляемости

Метод предназначен для быстрого определения количества кислорода, необходимого для химического окисления легкоокисляемых веществ, содержащихся в анализируемой воде. Кислород выделяется в результате разложения перманганата калия в кислой среде при кипячении в присутствии восстановителей:

$$4KMnO_4 + 6H_2SO_4 = 2K_2SO_4 + 4MnSO_4 + 6H_2O + 5O_2.$$

После окончания окисления определяют количество перманганата, не израсходованного на окисление, титрованием щавелевой кислотой:

$$2MnO_4^- + 5C_2O_4^{2-} + 16H^+ = 2Mn^{2+} + 8H_2O + 10CO_2.$$

Реактивы и оборудование: 0,01 н. раствор перманганата калия; 0,01 н. раствор щавелевой кислоты; серная кислота; конические колбы емкостью 250 см^3; бюретка.

1.6.1.1. Приготовление раствора серной кислоты. К 30 см^3 дистиллированной воды осторожно приливают 10 см^3 серной кислоты (удельный вес 1,84 г/см^3) и несколько капель 0,01 н. раствора перманганата калия до устойчивой розовой окраски. Раствор кипятят 30 мин. Если розовая окраска исчезнет, к раствору добавляют еще несколько капель 0,01 н. раствора перманганата калия.

1.6.1.2. Подготовка пробы. Сточные воды до очистки разбавляют перед анализом в 5 раз, а сточные воды, прошедшие очистку, разбавляют в 2 раза.

1.6.1.3. Ход анализа. В коническую колбу емкостью 250 см^3 приливают 75 см^3 дистиллированной воды, 5 см^3 раствора серной кислоты, 10 см^3 0,01 н. раствора перманганата калия, 10 см^3 разбавленной пробы. Для обеспечения равномерности кипения в реагирующую жидкость кладут кусочек пористого стекла, горло колбы закрывают маленькой воронкой, колбу ставят на включенную электроплитку и кипятят 10 мин после появления первых пузырей. После окончания окисления колбу снимают с электроплитки, вливают в нее 10 см^3 0,01 н. раствора щавелевой кислоты и сразу титруют раствором перманганата калия до появления розовой окраски, не исчезающей в течение 1 мин.

Параллельно проводят холостой опыт, в котором не добавляют сточные воды, а определяют окисляемость дистиллированной воды.

После окончания холостого опыта, не выливая реакционной жидкости, выполняют проверку титра 0,01 н. раствора $KMnO_4$ по щавелевой кислоте. В колбу с горячей реакционной жидкостью вливают 10 см^3 0,01 н. раствора щавелевой кислоты и оттитровывают ее 0,01 н. раствором перманганата калия до розовой окраски, не исчезающей на протяжении 1 мин. Поправочный коэффициент k для пересчета концентрации рабочего раствора $KMnO_4$ в точно 0,01 н. раствор рассчитывают по формуле

$$k = \frac{10}{a},$$

где a – объем 0,01 н. раствора перманганата калия, пошедший на титрование, см^3.

Окисляемость анализируемой пробы X, мг/дм^3, выражают количеством кислорода или перманганата калия, которое расходуется для окисления веществ, содержащихся в 1 дм^3 сточных вод, и вычисляют по формуле

$$X = \frac{(a - b) \cdot K \cdot k \cdot 1000}{g},$$

где a – объем 0,01 н. раствора перманганата калия, израсходованный на титрование щавелевой кислоты, см^3; b – объем 0,01 н. раствора перманганата калия, пошедший на титрование щавелевой кислоты в холостом опыте, см^3; K – 0,08 мг кислорода или 0,32 мг $KMnO_4$, которые эквивалентны 1 см^3 0,01 н. раствора перманганата калия; g – объем неразбавленной пробы, взятый на анализ, см^3.

1.6.2. Определение БПК

Для определения БПК сточных вод их разбавляют водой, содержащей 8–9 мг/дм^3 кислорода и практически не содержащей окисляемых органических веществ. Разбавление рассчитывают таким образом, чтобы кислорода, содержащегося в разбавляющей воде, хватило на полное окисление органических веществ, которые находятся в сточных водах. Разбавленные сточные воды анализируют на содержание кислорода, затем вводят в них ассоциацию почвенных микроорганизмов и инкубируют в термостате при температуре 20°С. Через соответствующее количество суток (5, 20) пробу снова анализируют на содержание кислорода. По изменению концентрации кислорода рассчитывают БПК анализируемых сточных вод через известное количество суток.

Реактивы и оборудование: KH_2PO_4; K_2HPO_4; $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$; NH_4Cl; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; $CaCl_2$; $FeCl_3 \cdot 6H_2O$; 0,1%-ный водный раствор бромтимолового синего; 0,05%-ный раствор метиленового синего; мерная колба емкостью 1 дм^3; мерная колба емкостью 500 см^3; склянки для инкубации с притертыми пробками и колпачками; хладотермостат.

1.6.2.1. Приготовление разбавляющей воды. Для ее приготовления используют дистиллированную воду, не содержащую едких щелочей, кислот, активного хлора и бактерицидных веществ. Содержание меди и свинца в ней не должно быть более 0,01 мг/дм^3. Готовят четыре раствора: фосфатный буфер, в 1 дм^3 которого содержится 8,5 г KH_2PO_4, 21,75 г K_2HPO_4, 33,4 г

$Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ и 1,7 г NH_4Cl (значение pH буферного раствора должно быть равно 7,2); раствор сернокислого магния, в 1 $дм^3$ которого содержится 22,5 г $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; раствор хлористого кальция, в 1 $дм^3$ которого содержится 27,5 г безводного $CaCl_2$; раствор хлористого железа, в 1 $дм^3$ которого содержится 0,25 г $FeCl_3 \cdot 6H_2O$. Затем в мерную колбу емкостью 1 $дм^3$ вносят по 1 $см^3$ каждого приготовленного раствора и дистиллированную воду до метки на колбе. Полученный раствор перемешивают и применяют для разбавления сточных вод при анализе.

1.6.2.2. Подготовка культуры микроорганизмов. В колбу вносят 2 г сухой почвы, прибавляют 100 $см^3$ дистиллированной воды, энергично взбалтывают в течение 5 мин и фильтруют через бумажный фильтр. Фильтрат используют для анализа.

1.6.2.3. Подготовка пробы. Анализируемые сточные воды нейтрализуют 1 н. раствором щелочи или 1 н. раствором кислоты до pH 7. Количество нейтрализующего реактива, которое необходимо добавить в пробу, определяют титрованием 10 $см^3$ сточных вод с индикатором бромтимолом синим.

Для проведения анализа сточные воды разбавляют водой, содержащей определенное количество кислорода. Ориентировочную величину разбавления получают, разделив величину перманганатной окисляемости на 5.

1.6.2.4. Ход анализа. В мерную колбу емкостью 500 $см^3$ вносят 5 $см^3$ сточных вод (если выбрано разведение 1 : 100), 1 $см^3$ воды с микроорганизмами и доводят объем разбавляющей водой до метки на колбе. Раствор перемешивают и разливают осторожно (без пузырьков воздуха) по стенкам в две инкубационные склянки. Склянки закрывают притертыми пробками, после чего разбавленные сточные воды наливают в колпачок и, перевернув склянку с жидкостью вверх дном, плотно вставляют ее в колпачок. Часть воды из колпачка при этом выливается. Склянку с колпачком переворачивают, ставят на дно и проверяют отсутствие пузырьков воздуха в колпачке и склянке. Колпачком закрывают одну из заполненных инкубационных склянок, а вторую используют для определения исходного содержания кислорода (см. п. 1.6.3).

Параллельно готовят контрольную пробу, которой является разбавляющая вода с микроорганизмами. В мерную колбу емкостью 500 $см^3$ вносят 1 $см^3$ воды с микроорганизмами и разбавляющую воду до метки на колбе. Раствор перемешивают и разливают

в две инкубационные склянки. Одну закрывают колпачком, как описано выше, а другую используют для определения исходного содержания кислорода (см. п. 1.6.3).

Две склянки, закрытые колпачками, помещают в хладотермостат при 20°С. Через 5 сут их достают и анализируют содержание кислорода после инкубации.

Количество кислорода, использованное микроорганизмами для окисления органических веществ, содержащихся в 1 дм^3 анализируемых сточных вод за 5 сут БПК$_5$, мг/дм^3, рассчитывают по формуле

$$\text{БПК}_5 = (C_0 - C) - (C_{0к} - C_к) \cdot n,$$

где C_0 – концентрация кислорода в разбавленной анализируемой пробе до инкубации, мг/дм^3; C – концентрация кислорода в разбавленной анализируемой пробе после инкубации, мг/дм^3; $C_{0к}$ – концентрация кислорода в контрольной пробе до инкубации, мг/дм^3; $C_к$ – концентрация кислорода в контрольной пробе после инкубации, мг/дм^3; n – разбавление пробы перед инкубацией.

Предостережения! 1. В прошедших биологическую очистку сточных водах развит процесс нитрификации, который продолжается при их инкубации. Количество кислорода, которое за время инкубации будет израсходовано на окисление азотистых соединений, может в несколько раз превышать количество кислорода, израсходованного на окисление органических веществ. Для прекращения процесса нитрификации необходимо на 1 дм^3 разбавляющей воды прибавить 6 см^3 0,05%-ного раствора метиленового синего.

2. При выполнении анализа необходимо особое внимание уделять чистоте инкубационных склянок. Перед анализом их надлежит вымыть хромовой смесью и высушить при 150–170°С.

1.6.3. Определение растворенного кислорода

Метод основан на йодометрическом определении кислорода, израсходованного на окисление двухвалентного марганца в четырехвалентный. Реакции протекают по следующим уравнениям:

$$MnSO_4 + 2NaOH = Mn(OH)_2 + Na_2SO_4;$$

$$2Mn(OH)_2 + O_2 = 2H_2MnO_3.$$

Белый осадок гидроксида марганца быстро окисляется растворенным в воде кислородом, при этом образуется марганцеватистая

кислота (коричневый осадок). Этот осадок растворяют серной кислотой в присутствии йодистого калия. Четырехвалентный марганец восстанавливается йодом до двухвалентного по уравнению

$$H_2MnO_3 + 2H_2SO_4 + 2KI = MnSO_4 + I_2 + K_2SO_4 + 3H_2O.$$

Количество свободного йода, эквивалентное количеству растворенного кислорода, определяют титрованием раствором гипосульфита натрия.

Реактивы и оборудование: H_2SO_4; $MnSO_4 \cdot 2H_2O$; NaOH; KI; $Na_2S_2O_3$; конические колбы емкостью 500 $см^3$; склянки для инкубации; кристаллизатор; бюретка.

1.6.3.1. Приготовление реактивов.

а) серная кислота (разбавленная водой в соотношении 2 : 3);

б) насыщенный раствор сернокислого марганца (400 г $MnSO_4 \cdot 2H_2O$ на 1 $дм^3$ дистиллированной воды);

в) щелочной раствор йодистого калия. В фарфоровую чашку наливают 450 $см^3$ дистиллированной воды и растворяют в ней 750 г едкого натра, добавляя его небольшими кусочками при постоянном перемешивании. После растворения едкого натра раствор переливают в прозрачную склянку и оставляют для отстаивания на 2–3 сут. После отстаивания прозрачный раствор едкого натра сливают в сухую чистую склянку.

В мерной колбе на 1 $дм^3$ растворяют 150 г йодистого калия в 250 $см^3$ дистиллированной воды. К полученному раствору прибавляют приготовленный раствор едкого натра в таком количестве, которое содержит 500 г NaOH. Объем доводят дистиллированной водой до метки, тщательно перемешивают и проверяют на содержание свободного йода. Для этого 3–5 $см^3$ щелочного раствора нейтрализуют кислотой до кислой реакции и прибавляют 2 капли раствора крахмала. Если в растворе нет свободного йода, то он останется бесцветным. Посинение раствора свидетельствует о наличии йода;

г) 0,01 н. раствор серноватистокислого (гипосульфита) натрия ($Na_2S_2O_3$). Раствор готовят из фиксанала или по навеске. Дистиллированную воду для приготовления раствора кипятят в течение 2 ч для удаления CO_2. Затем колбу закрывают пробкой с хлоркальциевой трубкой, которая заполнена натронной известью (смесь едкого натра и гашеной извести), охлаждают воду до комнатной температуры и используют ее для приготовления раствора. Рас-

твор гипосульфита натрия консервируют, добавляя на 1 дм^3 раствора 4 см^3 1 н. раствора едкого натра и 5 см^3 хлороформа. Гипосульфит хранят в темной стеклянной посуде. Перед использованием проверяют титр раствора гипосульфита следующим образом.

В коническую колбу емкостью 250 см^3 наливают 5 см^3 серной кислоты (2 : 3), 3 см^3 свежеприготовленного 10%-ного раствора йодистого калия и 20 см^3 0,01 н. раствора $K_2Cr_2O_7$. Колбу с раствором ставят в темное место на 10 мин, после чего добавляют в нее 50 см^3 дистиллированной воды и титруют раствором гипосульфита в присутствии крахмала до перехода синей окраски раствора в светло-зеленую. Концентрацию раствора гипосульфита N, н., рассчитывают по формуле

$$N = \frac{0,01 \cdot 20}{V},$$

где V – объем раствора гипосульфита, пошедший на титрование, см^3;

д) 0,5%-ный раствор крахмала. В фарфоровой чашке тщательно перемешивают 0,5 г растворимого крахмала с 5 см^3 дистиллированной воды и быстро выливают в склянку с 95 см^3 кипящей воды, хорошо перемешивают, доводят до кипения. После охлаждения раствор фильтруют и переливают в капельницу, добавив 0,125 г салициловой кислоты.

1.6.3.2. Ход анализа. Для анализа берут всю воду из склянки для инкубации. Склянку ставят в стеклянный кристаллизатор и достают из нее пробку. Пипетку объемом 1 см^3 заполняют раствором сернокислого марганца и, опустив ее в склянку на 4–5 см, выливают раствор в анализируемую пробу. Таким же образом в содержимое склянки вводят 1 см^3 щелочного раствора йодистого калия. Затем склянку закрывают пробкой, ее содержимое тщательно перемешивают и оставляют для отстаивания. Во время этой операции из склянки удаляется 2 см^3 анализируемой жидкости, которую учитывают при расчетах.

После осаждения всего осадка в склянку вносят 3 см^3 серной кислоты (2 : 3), закрывают ее пробкой и жидкость в склянке перемешивают до полного растворения осадка (3 см^3 прозрачной жидкости, которая выливается из склянки в результате добавления кислоты, в расчетах не учитывают, поскольку содержащийся в ней кислород уже прореагировал с марганцем). После растворения осадка, когда жидкость приобретает цвет выделившегося йода, ее

количественно переносят в коническую колбу емкостью 500 см^3 и титруют раствором гипосульфита в присутствии крахмала до исчезновения синей окраски раствора.

Концентрацию кислорода C, мг/дм^3, в анализируемой жидкости рассчитывают по формуле

$$C = \frac{a \cdot 0{,}08 \cdot 1000}{V - 2},$$

где a – объем 0,01 н. раствора гипосульфита, израсходованный на титрование, см^3; 0,08 – количество кислорода, эквивалентное 1 см^3 0,01 н. раствора гипосульфита, мг; V – объем склянки с анализируемой жидкостью, см^3; $(V - 2)$ – объем жидкости, взятой на анализ, см^3.

1.6.4. Определение фосфора фосфатного колориметрическим методом

Определение фосфора основано на реакциях получения молибденовой сини. Фосфор, связанный в минеральных соединениях, устанавливают непосредственно в пробе. Фосфор, связанный в органических соединениях, определяют после минерализации пробы, при этом количество найденного фосфора составляет сумму фосфора в минеральных и органических соединениях, содержащихся в пробе.

Соединения, содержащие фосфор, обрабатывают молибденовокислым аммонием в кислой среде в присутствии восстановителя (аскорбиновой кислоты). В присутствии молибденовокислого аммония образуется фосфорномолибденовая кислота:

$$PO_4^{3-} + 3(NH_4)_2MoO_4 \rightarrow H_3[P(Mo_3O_{10})_4].$$

При воздействии сильных восстановителей в кислой среде шестивалентный молибден восстанавливается, образуя соединения низших степеней окисления разной окраски. Соединения, соответствующие формуле Mo_nO_{3n-x}, где x может быть равно 1, 2, 3, имеют синюю и фиолетовую окраску. Смесь этих соединений называют молибденовой синью.

Количество образованных окрашенных соединений пропорционально количеству фосфора, присутствующего в реакционной смеси. Интенсивность окраски раствора молибденовой синью оценивают с помощью фотоэлектроколориметра.

Реактивы и оборудование: H_2SO_4; $(NH_4)_2MoO_4$; аскорбиновая кислота; термостат; фотоэлектроколориметр.

1.6.4.1. Приготовление смешанного реактива.

а) 2 н. раствор серной кислоты. В мерную колбу вместимостью 1000 $см^3$ помещают 54,32 $см^3$ концентрированной серной кислоты, доводят до метки дистиллированной водой, хорошо перемешивают;

б) 2,5%-ный раствор аммония молибденовокислого. В мерную колбу вместимостью 100 $см^3$ вносят 2,5 г молибденовокислого аммония, доводят до метки дистиллированной водой, хорошо перемешивают. Данный раствор стабилен в течение месяца;

в) 10%-ный раствор аскорбиновой кислоты. В мерную колбу вместимостью 25 $см^3$ помещают 2,5 г аскорбиновой кислоты, доводят до метки дистиллированной водой, хорошо перемешивают;

г) приготовление смешанного реактива. Смешивают 30 $см^3$ 2 н. серной кислоты, 10 $см^3$ 10%-ного раствора аскорбиновой кислоты и 10 $см^3$ 2,5%-ного раствора молибденовокислого аммония. Смешанный реактив готовится непосредственно перед использованием.

1.6.4.2. Колориметрический анализ. В пробирки отбирают по 2 $см^3$ исследуемого раствора и по 2 $см^3$ смешанного реактива, приготовленного, как описано выше (см. п. 1.6.4.1). Пробы помещают в термостат при температуре 37°С на 1 ч. Анализ полученных растворов проводят колориметрированием на ФЭК-М при длине волны 820 нм и толщине кюветы 0,5 см. Раствор сравнения – дистиллированная вода. По уравнению, полученному для описания калибровочной кривой зависимости экстинкции реакционной смеси от концентрации фосфора (см. п. 1.6.4.3), рассчитывают концентрацию фосфора в пробе.

1.6.4.3. Построение калибровочного графика и определение уравнения для расчета содержания фосфора фосфатного. Готовят основной эталонный раствор, в котором концентрация фосфора составляет 20 $мг/дм^3$. Для этого 8,77 мг KH_2PO_4 растворяют в 100 $см^3$ дистиллированной воды. Основной эталонный раствор разбавляют дистиллированной водой в таких соотношениях, чтобы получить рабочие эталонные растворы, содержащие различные количества фосфора: 0,1; 0,2; 0,4; 0,5; 0,8; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 4,0; 5,0; 8,0 10,0 $мг/дм^3$.

Рабочие эталонные растворы подвергают колориметрическому анализу (см. п. 1.6.4.2), повторяя каждый анализ не менее трех раз и из полученных результатов вычисляя среднее значение.

Одновременно анализируют не более трех растворов, поскольку окраска реакционной смеси меняется при длительном стоянии. По полученным данным строят график зависимости экстинкции реакционной смеси от концентрации фосфора в анализируемом растворе (мг/дм^3) и определяют уравнение для расчета содержания фосфора фосфатного.

1.6.5. Определение фосфора общего

Реактивы и оборудование: H_2SO_4; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$; Na_2SO_4; $(NH_4)_2MoO_4$; аскорбиновая кислота; колбы Кьельдаля емкостью 500 см^3; мерные колбы на 50 см^3; установка для минерализации; термостат; фотоэлектроколориметр.

Ход анализа. Для определения общего фосфора, связанного как в минеральных, так и в органических соединениях, проводят предварительную минерализацию. Для этого в колбу Кьельдаля емкостью 500 см^3 вносят 25 см^3 анализируемых сточных вод, 10–15 см^3 концентрированной серной кислоты, 0,78 г $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ и 1 г Na_2SO_4. Содержимое колбы перемешивают, закрепляют колбу в установке для минерализации и кипятят до полного обесцвечивания реагирующей смеси.

После минерализации колбу с реакционной жидкостью охлаждают и добавляют 200 см^3 дистиллированной воды для растворения солей. Из полученного раствора отбирают 25 см^3, переносят в мерную колбу на 50 см^3 и нейтрализуют 30%-ным раствором едкого натра в присутствии индикатора метилового красного до светло-желтого цвета. Раствор охлаждают, объем доводят дистиллированной водой до метки и перемешивают. Если полученный раствор мутный, то его фильтруют, а потом анализируют на содержание фосфора фосфатного колориметрическим методом (см. п. 1.6.4.2). При расчете концентрации общего фосфора учитывается разбавление в 16 раз.

1.6.6. Очистка сточных вод в аэробных условиях

Перед очисткой измеряют величину pH сточных вод и при необходимости проводят корректировку до значения pH 7. 300 см^3 нейтрализованных сточных вод заливают в реактор емкостью 1000 см^3 и помещают в него аэратор с пористой насадкой. Реактор ставят в термостат при температуре 30°С на 2 сут. После очистки определяют перманганатную окисляемость, БПК, содержание фосфора фосфатного и общего в биологически очищенных сточных водах.

2 СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ АНАЭРОБНОЙ ОЧИСТКИ СТОЧНЫХ ВОД

2.1. Влияние условий анаэробной очистки сточных вод на выход и состав биогаза

Анаэробная очистка сточных вод считается нестабильным и сложным для контроля процессом, главная причина – недостаток знаний о микробиологии анаэробных процессов и приемлемых эксплуатационных данных. В отличие от аэробных процессов очистки сточных вод скорость анаэробных процессов ниже, чувствительность к токсинам выше, время пуска биореактора больше.

2.1.1. Стадии анаэробного процесса

Анаэробная деструкция загрязнений сточных вод и органических отходов начинается при создании анаэробных условий за счет спонтанно развивающихся микроорганизмов, присутствующих в воде или отходах и окружающей среде, либо за счет специальной микробной инокуляции активным илом стабильно работающего анаэробного биореактора.

Процесс анаэробного превращения органических веществ в биогаз (биометаногенез) протекает через четыре последовательных стадии:

– стадия гидролиза сложных биополимерных молекул (белков, липидов, полисахаридов) на более простые олиго- и мономеры: аминокислоты, углеводы, жирные кислоты и др. Эти мономеры могут адсорбироваться и затем утилизироваться бактериальными клетками. Осуществляется экзогенными ферментами, экскретируемыми в ферментационную среду факультативно анаэробными гидролитическими микроорганизмами;

– на кислотогенной стадии образовавшиеся мономеры конвертируются факультативно анаэробными и анаэробными бактериями-бродильщиками в ряд простых соединений. При расщеплении моносахаридов образуются органические кислоты и спирты, многие из них деградируются до летучих кислот с короткой цепью. Глицерол далее утилизируется, а жирные кислоты расщепляются до двухуглеродных органических соединений (например, уксусной кислоты). Продукты расщепления аминокислот зависят от строения углеводородного радикала, основные продукты – органические кислоты (муравьиная, уксусная, пропионовая, бутановая, валериановая, изовалериановая). Также образуются молочная кислота, метанол, CO_2, H_2, NH_3 и H_2S;

– на ацетогенной стадии образовавшиеся на предыдущей стадии продукты конвертируются в ацетат, H_2, CO_2. В результате глубокого расщепления аминокислот высвобождаются аммоний и серосодержащие соединения. Ацетат (составляет около 85%) и бутират используются как субстраты метанобразующими бактериями, а аммоний увеличивает щелочность реактора или обусловливает токсический эффект;

– на метаногенной стадии уксусная кислота, H_2 и CO_2, муравьиная кислота и метанол трансформируются в метан и CO_2 строго анаэробными метаногенными бактериями.

2.1.2. Взаимосвязь стадий анаэробного процесса

Процесс анаэробной деструкции загрязнений протекает наиболее эффективно, если скорости деградации субстратов на всех стадиях сопоставимы. Ингибирование стадии гидролиза или большое количество взвешенных и коллоидно-растворенных веществ в поступающей на очистку воде приводит к замедлению поступления субстрата (мономерных веществ) на кислотогенную стадию, и количество продукта последней стадии – метана – неизбежно снижается. Перегрузка анаэробного биореактора по растворенным легкодеградируемым загрязнениям или ингибирование ацетогенной стадии вызывает накопление в биореакторе органических кислот с длинной цепью, спиртов и соединений органического азота. Если ингибируется метаногенная стадия, то накапливаются органические кислоты с короткой цепью, продуцируемые на второй и третьей стадиях, уменьшается буферная емкость анаэробного биореактора, что приводит к снижению pH в нем.

Состав поступающих на очистку сточных вод определяет качественный состав микробиоты активного ила и разнообразие веществ-субстратов, образующихся на первых трех стадиях анаэробной деструкции загрязнений. Изменение условий эксплуатации анаэробного биореактора (температура, pH, объемный расход и состав поступающих сточных вод) вызывает изменение условий жизнедеятельности микробного сообщества, количества преобладающих бактерий, что существенно изменяет качественный и количественный состав субстратов, доступных для метанобразующих бактерий, их активность и в конечном итоге состав биогаза и его количество.

Наиболее частые нарушения работы анаэробного биореактора связаны с ингибированием метанобразующих бактерий (четвертая стадия). При нормальном режиме работы органические кислоты с короткой цепью с ацетогенной стадии нейтрализуются ионами аммония, присутствующими в среде реактора вследствие деструкции аминокислот, с образованием солей аммония. В результате в биореакторе формируется слабощелочная среда. Аммоний также реагирует с диоксидом углерода и водой, получающийся карбонат аммония обеспечивает буферность (щелочность) системы. Лимитирование стадии конверсии летучих кислот в метан приводит к тому, что метанобразующие бактерии получают очень мало энергии при деградации кислот, поэтому прирост биомассы метаногенных бактерий и количество биогаза снижаются.

Ацетатобразующие бактерии растут в симбиотической связи с метанобразующими бактериями. Например, при конверсии этанола в ацетат с использованием диоксида углерода также образуется молекулярный водород, при повышении его парциального давления ацетатобразующие бактерии угнетаются, однако метанобразующие бактерии используют водород при синтезе метана из диоксида углерода, в результате чего парциальное давление водорода в системе биореактора незначительно. Сульфатвосстанавливающие бактерии нуждаются в том же субстрате, что и метанобразующие бактерии, – водороде и ацетате. При соотношении ацетата к сульфат-ионам менее двух сульфатвосстанавливающие бактерии вытесняют метанобразующие, при соотношении более трех побеждают метанобразующие бактерии. Продуктом жизнедеятельности сульфатвосстанавливающих бактерий является сероводород, который оказывает на метаногенные бактерии ингибирующее влияние при высоких концентрациях.

2.1.3. Характеристика метанобразующих бактерий

Метанобразующие бактерии – морфологически различная группа микроорганизмов с разной удельной скоростью роста и потребляемыми субстратами. Эти бактерии очень чувствительны к молекулярному кислороду, имеют неригидную клеточную стенку, уникальное строение липидной мембраны, некоторые способны к фиксации молекулярного азота. Ниже приведен элементный состав бактериальных клеток (по сухой массе), %: C – 50, O – 20, N – 12, H – 8, P – 2, S – 1, K – 1, остальные элементы – 6.

Метанобразующие бактерии классифицируют в соответствии с их структурой, утилизируемым субстратом, типами синтезируемых ферментов, температурным диапазоном роста. Активность метанобразующих бактерий обычно оценивают по уменьшению концентрации летучих кислот (субстрата) или по выходу метана (продукта). Эти бактерии очень медленно делятся из-за малого количества энергии, получаемой из ограниченного количества субстратов: водород, формиат, метанол, диоксид углерода, монооксид углерода, метиламин, диметилсульфид, диметиламин, триметиламин, ацетат.

Метанобразующие бактерии в соответствии с потребляемым ими субстратом подразделяются на три группы:

1) водородотрофные – используют в качестве субстрата водород и диокисид углерода, они менее распространены, чем остальные;

2) ацетотрофные – расщепляют ацетат на метан и диоксид углерода, некоторые используют монооксид углерода и воду, делятся медленнее, чем водородотрофные, на них очень влияет парциальное давление водорода, составляют в среднем около 70% метаногенных бактерий анаэробного биореактора;

3) метилотрофные – растут на субстратах с метильной группой (метанол, метиламины), не синтезируют метан из оксидов углерода, составляют около 30% метаногенных бактерий анаэробного биореактора.

Метанобразующие бактерии по отношению к температуре являются мезофильными (30–35°C) и термофильными (50–60°C). В интервале температур 40–45°C деятельность и тех и других сильно подавлена. Культивирование метаногенных бактерий в чистой культуре осложнено из-за строгих требований к анаэробиозу и ограниченного круга субстратов.

2.1.4. Факторы, влияющие на анаэробный процесс очистки сточных вод

Процесс контроля анаэробного биореактора труден, поскольку эксплуатационные условия тесно связаны, и изменение одного может прямо или косвенно изменить другие. Вторая сложность достижения приемлемых условий заключается в присутствии различных бактериальных групп, которые имеют разные оптимальные режимы. Рассмотрим основные параметры, которые влияют на анаэробный процесс.

Значение pH и щелочность. Ферментативная активность бактерий сильно зависит от pH. Оптимум pH для метаногенных бактерий 6,8–7,2, нижним пределом приемлемой деятельности для них является pH 6,2. Однако это значение pH считается оптимальным для ацетатобразующих бактерий. При синтезе уксусной кислоты pH сильно уменьшается, и скорость потребления ее метаногенными бактериями недостаточна, что приводит к более быстрому снижению pH, реактор закисляется. Также на pH сильно влияет количество образующегося диоксида углерода в составе биогаза и ионов аммония, образующихся при утилизации аминокислот. Положительно и отрицательно заряженные ионы, присутствующие в среде анаэробного биореактора, формируют буферную систему, которая обеспечивает поддержание стабильного pH. В условиях подкисления среды органическими кислотами (в первую очередь – уксусной) и утилизации их метаногенными бактериями особенно важно знать количество ионов, обеспечивающих подщелачивание среды, – так называемую щелочность.

Показатель pH хорошо отражает недавно происходившие в биореакторе процессы, тогда как щелочность показывает, что в настоящий момент происходит, и даже позволяет предположить степень стабильности pH в течение некоторого времени. Изменение щелочности связано с синтезом или потреблением кислотных и щелочных компонентов при деградации субстрата. Снижение щелочности обусловливает быстрое изменение pH при незначительном изменении концентраций положительно и отрицательно заряженных ионов и является индикатором скорого сбоя в работе анаэробного биореактора.

Щелочность анаэробного биореактора представлена в первую очередь аммиаком (продуктом деградации аминокислот), находящимся в равновесии с ионами аммония в среде биореактора,

и бикарбонатами, находящимися в равновесии с диоксидом углерода в биогазе при данном pH. Равновесие между карбоновой кислотой, бикарбонат- и карбонат-ионами, как и между аммиаком и ионами аммония, зависит от pH:

$$CO_2 + H_2O \leftrightarrow H_2CO_3 \leftrightarrow H^+ + HCO_3^- \leftrightarrow 2H^+ + CO_3^-;$$

$$NH_3 + H^+ \leftrightarrow NH_4^+.$$

Аммиак растворяется в воде и с диоксидом углерода формирует бикарбонат аммония:

$$NH_3 + H_2O + CO_2 \leftrightarrow NH_4HCO_3.$$

Аммонийные соли органических кислот утилизируются метаногенными бактериями с высвобождением аммиака, который снова участвует в обеспечении щелочности системы.

Часто для достижения устойчивого pH, а значит, для повышения щелочности системы в анаэробный биореактор добавляют источники щелочности извне. Их количество основано на предполагаемой емкости по органическим кислотам в подаваемой загрузке из расчета 1 г кислот на 1 г растворенных веществ. Необходимость внесения щелочности извне обоснована также, если скорость кислотогенеза больше скорости метаногенеза (например, при пуске, перегрузке, отклонении от температурного режима, ингибировании).

Поскольку требуется бикарбонатная щелочность, в основном используются бикарбонаты. Бикарбонаты натрия и калия имеют хорошую растворимость и оказывают минимальное токсическое воздействие на ил по сравнению с другими источниками щелочности, передозировка их не приводит к значительному увеличению pH выше оптимального, но в результате гидролиза в среду биореактора высвобождается дополнительный CO_2.

Карбонат кальция может применяться для доведения pH до 6,4, а затем используется бикарбонат калия или натрия для доведения до оптимального pH. $CaCO_3$ повышает pH быстро и поэтому с негативным воздействием на бактерии, но он несущественно увеличивает щелочность, передозировка может привести к превышению оптимального pH. С осторожностью применяют гидроксид кальция и карбонат натрия, поскольку сначала они реагируют с растворенным CO_2, смещая равновесие, и диоксид углерода переходит из газовой фазы в жидкую. Длительное использование гидроксида кальция приводит к выпадению в осадок $CaCO_3$, что может

способствовать повышению концентрации нежелательного минерального осадка в нижней части биореактора.

Применение для регулирования щелочности водного аммония приводит к растворению минеральных осадков (например, бикарбоната кальция), однако давление в биореакторе снижается из-за изъятия диоксида углерода при образовании бикарбоната аммония. При повышенном pH значительная концентрация ионов аммония вызывает ингибирование метаногенных микроорганизмов.

Использование для увеличения щелочности нитрата натрия приводит к высвобождению в среду биореактора молекулярного азота и оксида азота N_2O и к повышению окислительно-восстановительного потенциала (ОВП) биореактора.

Следует избегать избыточной щелочности системы, ее можно нейтрализовать добавлением хлорида железа или цитрата железа. Для нивелирования недостатков длительного применения вносимых факторов щелочности предпочтительно использовать смесь катионов.

Время пребывания. Время пребывания (или гидравлического удержания) очищаемых сточных вод (отношение рабочего объема биореактора ($м^3$) к объемному расходу поступающих на очистку сточных вод ($м^3$/ч)) определяет количество питательных веществ, поступающих в биореактор. Накопление минеральных осадков (песка, карбоната кальция) в нижней части биореактора приводит к снижению его рабочего объема, поэтому подобные осадки нужно периодически удалять.

Нагрузка по питательным веществам на биореактор чаще всего выражается в единицах растворимого или суммарного химического потребления кислорода (ХПК) на единицу объема биореактора (кг ХПК/($м^3$ · сут)) или на единицу сухой массы активного ила (кг ХПК/(кг · сут)) в единицу времени. Увеличение нагрузки по питательным веществам определяется возможностями биоценоза анаэробного биореактора, при превышении их степень очистки сточных вод снижается. Рабочая нагрузка по удаляемым загрязнениям для метантенка составляет 0,5–5,0 кг ХПК/($м^3$ · сут). Для повышения нагрузки по питательным веществам требуется увеличение количества биомассы в объеме биореактора. В метантенке для этого специальных приспособлений нет, активная биомасса опускается на дно биореактора, тогда как вывод сброженного остатка организуется на некоторой высоте от дна метантенка.

Это способствует некоторому увеличению времени удержания биомассы активного ила в объеме биореактора, при этом повышается скорость удаления органических загрязнений, снижается требуемый объем биореактора, обеспечивается требуемая буферная емкость для защиты от шоковых нагрузок и токсичных компонентов, достигается биологическая акклиматизация к токсичным компонентам.

Более эффективное увеличение концентрации бактерий в объеме биореактора возможно путем использования различных методов удержания биомассы: иммобилизации на поверхности или в пустотах загрузочного материала, ультрафильтрации выводимой из аппарата жидкости через синтетические мембраны, применения газоилоотделительных устройств, обеспечивающих формирование в аппарате агрегатов клеток (компактных флокул и гранул) с высокой седиментационной способностью. Эти принципы удержания биомассы реализуются в анаэробных реакторах второго поколения: анаэробных биофильтрах с неподвижным слоем загрузки (допустимая нагрузка по утилизируемым загрязнениям 5−15 кг ХПК/($м^3$ · сут)), биореакторах с гранулированной биомассой типа UASB (20−30 кг ХПК/($м^3$ · сут)), комбинированных биореакторах (до 30 кг ХПК/($м^3$ · сут)) и биореакторах с псевдоожиженным слоем носителя (до 40 кг ХПК/($м^3$ · сут)). Концентрация активного ила по сухой массе в анаэробных биореакторах второго поколения достигает 100 кг/$м^3$ и более.

Особый интерес представляет применение биореакторов типа UASB, в которых используется прохождение восходящего потока сточных вод через слой плотных легко оседающих гранул анаэробного ила. Биореактор отличается от остальных типов тем, что не имеет загрузки, которая занимает часть рабочего объема биореактора, уменьшая его. Отсутствие загрузки также снимает проблему заиливания и нарушения анаэробности процесса при ее регенерации. По сравнению с биореактором с псевдоожиженным слоем ила затраты на перемещение жидкости меньше. Гранулы анаэробного активного ила формируются в объеме биореактора самопроизвольно, этому явлению способствуют следующие факторы: наличие центров, инициирующих гранулообразование (частиц органических и неорганических материалов и мелких, но плотных бактериальных агрегатов), состав сточных вод (наличие катионов кальция, углеводов и летучих органических кислот),

температура и величина pH ферментационной среды, гидродинамический режим в аппарате. Отрицательно влияют на качество гранулированного ила взвешенные частицы с волокнистой структурой, которые ухудшают седиментационные свойства ила и даже вызывают его всплывание.

В гранулах активного ила расстояния между бактериями минимальны и наиболее благоприятны для транспорта промежуточных продуктов разложения органического вещества, что увеличивает скорость анаэробной деструкции загрязнений. Метаногенная активность гранулированного ила выше, чем у флокулированного и значительно превышает активность дисперсной биомассы. Гранулы могут иметь разнообразную форму: сферическую, дисковидную, округлую или неправильную. Плотность их колеблется в пределах 1040−1080 кг/м^3.

Электронно-микроскопические исследования показали, что в микробной массе гранул преобладают нитчатые бактерии рода *Methanothrix*, которые, как считают большинство исследователей, играют решающую роль в формировании гранул. Между нитями метанотрикса в виде микроколоний и в свободной форме располагается большое количество морфологически разнообразных форм бактерий остальных представителей анаэробного биоценоза. Формирующиеся в производственных стоках гранулы активного ила могут иметь черную окраску, обусловленную адгезией на нитях метанотрикса сульфида железа, который, как предполагают, также принимает участие в инициировании процесса гранулообразования и стабилизации агрегатов. Содержание экзополимеров полисахаридной природы в гранулированном иле составляет обычно 2−5% от сухой массы. Большинство исследователей признают определяющую роль экзополимеров в образовании матрицы для удержания клеток бактерий и придания стабильности формирующимся агрегатам.

Для более эффективного использования преимуществ гранулированного ила разработаны конструкции анаэробных биореакторов с расширенным слоем гранулированного ила (EGSB) и с внешней циркуляцией слоя гранулированного ила (ECSB).

Температура. Метанобразующие бактерии активны при мезофильных (30–35°C) и термофильных (50–55°C) условиях, при температурах от 40 до 45°C метанобразующие бактерии ингибированы. Изменение температуры даже на пару градусов влияет

почти на всю биологическую активность микробиоты биореактора, включая ингибирование метаногенных бактерий. Для предотвращения появления локальных участков с различающейся температурой нужно тщательно перемешивать содержимое биореактора.

При снижении температуры более чем на 3°С должно точно контролироваться соотношение количества летучих органических кислот и величины щелочности. Органические кислоты при такой температуре продолжают синтезироваться (оптимум для ацетогенов 30°С), а метаногенная активность подавлена. При температуре 21°С и менее метаногенная активность в условиях биореактора полностью подавлена из-за закисления биореактора.

Скорость анаэробной деструкции загрязнений существенно больше (на 25–50%) при термофильных условиях, чем при мезофильных. Термофильный режим характеризуется низким приростом биомассы, большой скоростью эндогенного распада бактерий и недостаточной приспособляемостью их к изменяющимся условиям (количеству питания, температуре, pH). Скорость изменения температуры – не более 1 град/сут для термофильных условий деструкции, для мезофильных – не более 2–3 град/сут. Акклиматизация метанобразующих бактерий к другому оптимуму температуры должна проходить очень медленно также из-за малой скорости их размножения.

Влияние температуры на гидролиз взвешенных и коллоидных веществ не очень значительный, гидролитические бактерии не так чувствительны к изменению температуры, как ацетогенные и метанобразующие. Но температура влияет на активность ферментов, поэтому время удержания биомассы должно увеличиваться со снижением температуры.

Окислительно-восстановительный потенциал (ОВП) – показатель вида биохимического процесса, а также количества содержащихся в воде или в иле молекул, которые способны забирать или отдавать электроны (обладающих окислительным или восстановительным потенциалом соответственно). Показатель ОВП определяют, например, с использованием электрометрического pH-метра с милливольт-шкалой. Зависимость ОВП от преимущественно протекающего в среде процесса представлена в табл. 2.1.

Анаэробы деградируют субстрат более эффективно, если окислительно-восстановительный потенциал окружающей их жидкой среды находится в интервале от –200 до –400 мВ.

Таблица 2.1

Зависимость ОВП от преимущественно протекающего процесса

Показатель ОВП, мВ	Молекула – переносчик электронов	Выводимый из системы продукт	Процесс	Прирост клеточной массы, кг/кг деградированного ХПК
Более +50	O_2	H_2O	Аэробное дыхание	0,4–0,6
От +50 до –50	NO_2^- или NO_3^-	N_2 или N_2O	Денитрификация	0,4
От –50 до –100	SO_4^{2-}	S^{2-} (H_2S)	Восстановление сульфатов	0,04–0,10
От –100 до –300	Органические соединения	Летучие органические кислоты	Разные типы брожения	0,04–0,10
Менее –300	CO_2	CH_4	Метаногенез	0,02–0,04

Биогенные элементы и микроэлементы. Потребность микроорганизмов анаэробного ила в макроэлементах может быть определена расчетным путем либо по остаточным концентрациям их в очищенной воде. Если элементы там не обнаружены, их нужно вносить дополнительно.

Для количественной оценки органических веществ в сточных водах традиционно используется показатель биохимического потребления кислорода (БПК). При этом оценивается количество растворенного кислорода, нужного для окисления субстрата, тогда как кислород не используется анаэробными микроорганизмами. Время пребывания сточных вод в метантенках (до 12 сут) больше, чем время проведения анализа на определение величины БПК (5 сут). Таким образом, в составе этого показателя загрязненность воды часто недооценивается, поэтому пользуются показателями ХПК либо общего органического углерода.

Соотношение биогенных элементов (азота, фосфора) и ХПК находится в обратно пропорциональной зависимости от нагрузки на анаэробный биореактор по органическим веществам: соотношения ХПК : N : P = 1000 : 7 : 1 и 350 : 7 : 1 используются для высоконагружаемых и низконагружаемых биореакторов соответственно. При этом среднее соотношение C : N должно составлять 25 : 1, что соответствует наибольшему выходу биогаза. Примерно 10% потребленного ХПК расходуется на построение новой

бактериальной массы. В расчетах принимается, что 12% сухого веса клеток приходится на азот и примерно 2% на фосфор. Рекомендуемые остаточные концентрации аммонийного азота и фосфора ортофосфатного в отводимой воде равны 5 и 1–2 мг/дм^3 соответственно.

Для обогащения азотом применяются хлорид аммония, раствор аммиака, мочевина. Хотя азот в виде иона аммония предпочтителен для метанобразующих бактерий, они могут получать его из других источников – путем фиксации молекулярного азота и из аланина. В качестве источника фосфора желателен ортофосфат. Для усвоения серы клетками анаэробных бактерий молекула сероводорода должна быть неионизирована, эта форма типична для pH 6,8–6,9. Для дополнительного внесения серы пригодны аминокислоты: цистеин и метионин.

Обязательными микроэлементами для метанобразующих бактерий при конверсии ацетата до метана являются кобальт, железо, никель и сера. Например, добавление никеля может увеличить потребление ацетата метанобразующими бактериями, поэтому присутствие достаточного количества его помогает минимизировать риск сбоя, обусловленного накоплением органических кислот. Дополнительные микроэлементы, в следовых количествах влияющие на ферменты метаногенных бактерий, – селен, молибден и вольфрам. Нехватка микроэлементов может быть ошибочно расценена как симптом токсичности. Для обогащения микроэлементами может использоваться дрожжевой экстракт.

Метанобразующие бактерии легко извлекают микроэлементы из объема жидкости благодаря внеклеточной слизи, захватывающей (адсорбирующей) их и транспортирующей внутрь клетки. Это также позволяет накапливать их в количествах, превышающих потребности.

Токсичность. Токсичность тех или иных веществ определяется способностью бактерий адаптироваться к постоянной концентрации их, отсутствием или присутствием других токсичных веществ, изменениями в условиях эксплуатации.

Наиболее сильно влияют на процесс анаэробной очистки сточных вод: спирты (изопропанол) – при концентрации выше 100–200 мг/дм^3; катионы кальция, магния, калия и натрия; аммиак – при концентрации, превышающей 1500 мг/дм^3; ароматические соединения – более 20 мг/дм^3; ПАВ (лаурилсульфат); химические ингибиторы, используемые как консерванты в пищевой промыш-

ленности; хлорированные углеводороды – более 20 мг/дм^3; цианиды – более 4 мг/дм^3; формальдегид; тяжелые металлы, такие как: железо – более 5 мг/дм^3, медь – более 1 мг/дм^3, цинк – более 20 мг/дм^3; сероводород – более 50 мг/дм^3; альтернативные акцепторы электронов – нитрат- и сульфат-ионы; азотсодержащие органические соединения (например, акрилонитрил – более 5 мг/дм^3); кислород; фармацевтические препараты; растворители; органические кислоты с длинной цепью.

Индикаторами токсичности являются снижение продукции водорода, метана, уменьшение щелочности и pH, возрастание концентрации органических кислот. Наиболее часто токсичность обусловлена аммиаком, сульфидом водорода, тяжелыми металлами.

Ионы аммония используются бактериями как источник азота, но аммиак токсичен. С повышением pH количество свободного аммиака увеличивается. Токсический эффект сравним с таковым для синильной кислоты и сероводорода – все они токсичны в недиссоциированной форме. Неадаптированные бактерии могут ингибироваться при концентрациях свободного аммиака более 50 мг/дм^3. Шоковая нагрузка свободного аммония приводит к быстрому и значительному накоплению органических кислот и скачку pH, следовательно, снижается продукция метана, что также является индикатором аммиачной токсичности.

Бактериальные клетки используют растворенный сероводород как источник серы, однако избыточные концентрации сульфидов и растворенного сероводорода обусловливают токсичность при его концентрации более 200 мг/дм^3 при нейтральном pH. В анаэробном биореакторе сульфиды могут быть в растворимой (сульфид-ионы) и нерастворимой (сульфиды тяжелых металлов) форме. Нерастворимые сульфиды не могут проникнуть в бактериальную клетку, поэтому добавление железа предупреждает сульфидную токсичность. Для предотвращения интоксикации бактериальных клеток от присутствия сульфид-ионов необходимо: разбавление, отделение и отдельная обработка сульфат-, сульфидсодержащих сточных вод, осаждение сульфидов солями металлов, очистка и рециркуляция биогаза.

Растворимые тяжелые металлы адсорбируются на поверхности бактериальных клеток, оказывают токсическое влияние посредством инактивации ферментных систем из-за связи их с тиоловыми группами белков и могут быть удалены путем связывания с хелатирующими

соединениями, которые не проникают в клетку. Многие металлы присутствуют в форме нерастворимых солей и осадков, оксидов, гидроксидов, сульфидов и карбонатов, и потому недоступны для клеток. Значительное осаждение карбонатов и сульфидов металлов наблюдается при pH больше 7,5.

Альтернативные акцепторы электронов – нитрат- и сульфат-ионы – могут ингибировать метаногены из-за повышения ОВП. Поскольку сульфатвосстанавливающие бактерии могут конкурировать с метанобразующими бактериями за субстрат, продукция сероводорода при избытке сульфат-ионов будет преобладать над метангенерацией.

Щелочные металлы (кальций, магний, калий, натрий) обладают стимулирующим эффектом при концентрациях 100–400 мг/дм^3, однако при концентрациях более 1500 мг/дм^3 начинают ингибировать метанобразующие бактерии. Для предотвращения ингибирования в этих случаях сточную воду необходимо разбавлять.

Сравнительно высокие концентрации короткоцепочечных неионизированных органических кислот, таких как уксусная, пропионовая и бутановая, обусловливают снижение щелочности и скачок pH. Пропионат токсичен при концентрации более 5 мг/дм^3, что проявляется при pH около нейтрального и влияет на популяцию кислотообразующих и метанобразующих бактерий. Корректируют такую токсичность добавлением щелочных компонентов. Поскольку химический состав и структура некоторых длинноцепочечных жирных кислот (капроновой, каприловой, лауриловой, миристиновой, олеиновой) подобна структуре липидных компонентов мембран метанобразующих бактерий, эти кислоты встраиваются в клеточные мембраны, нарушая их проницаемость.

После рассмотрения факторов, влияющих на анаэробные процессы, можно составить перечень основных параметров и приблизительный диапазон, при котором активность метаногенных бактерий оптимальна (табл. 2.2).

Таким образом, на стабильность работы анаэробных биореакторов влияют гидравлическая перегрузка, перегрузка по органическим соединениям, внезапные изменения pH и температуры, токсичность.

Индикаторами расстройства являются изменения в количестве продуцируемого биогаза и его компонентном составе, уменьшение щелочности и pH, снижение деструкции растворимых соединений, увеличение концентрации органических кислот.

Таблица 2.2

Условия приемлемой активности метаногенных бактерий

Условие	Оптимум	Допустимые значения
Щелочность, мг/дм^3 по $CaCO_3$	1500–3000	1000–1500
Состав биогаза, об. %: – метан	65–70	60–65 и 70–75
– диоксид углерода	30–35	25–30 и 35–40
Гидравлическое время удержания, сут	10–15	7–10 и 15–30
pH	6,8–7,2	6,6–6,8 и 7,2–7,6
Температура, °С: – мезофильный режим	30–35	20–30 и 35–40
– термофильный режим	50–56	45–50 и 57–60
Органические кислоты, мг/дм^3 по уксусной кислоте	50–500	500–2000

Продукция биогаза не так важна, как концентрация метана в нем, поскольку именно метан является конечным веществом деградации органических соединений. Уменьшение концентрации метана может быть вызвано снижением количества субстрата и нестабильностью работы биореактора. Продукция биогаза и щелочность могут быть связаны, уменьшение их одновременно указывает на подавление деятельности метаногенных бактерий. Снижение продукции метана и отсутствие значительных изменений в щелочности свидетельствуют о токсичности, влияющей на метанобразующие и кислотообразующие бактерии.

Недостаток адекватного и своевременного мониторинга приводит к нарушению деятельности системы анаэробного биореактора. Для сточных и биологически очищенных вод ежедневно рекомендуется контролировать объемный расход, ХПК, pH, температуру; еженедельно – щелочность, концентрацию взвешенных веществ, аммонийного азота и органических кислот. Ежедневно контролируют количество биогаза в газгольдере, тогда как компонентный состав биогаза контролируется при необходимости (например, при изменении количества биогаза). Другие анализы (компонентный состав сточных вод и биологически очищенной воды) проводятся при необходимости. В течение пуска и нарушения деятельности системы биореактора частота контроля увеличивается.

2.2. Лабораторная работа. Очистка сточных вод в анаэробных условиях

Вопросы для самоподготовки. 1. Сравнительный анализ аэробного и анаэробного методов очистки сточных вод. 2. Основные стадии анаэробной биодеградации загрязнений сточных вод и их взаимосвязь. 3. Характеристика метанобразующих бактерий. 4. Факторы, влияющие на выход биогаза при анаэробной очистке сточных вод: pH, щелочность, время пребывания, нагрузка по питательным веществам на биореактор, температура, окислительно-восстановительный потенциал, наличие биогенных элементов и микроэлементов, токсичных компонентов. 5. Контроль работы анаэробного биореактора.

Цель работы – освоение методов установления химического потребления кислорода (ХПК), количества аммонийного азота и взвешенных веществ в сточных и биологически очищенных водах, показателей щелочности и окислительно-восстановительного потенциала, содержания органических кислот в биологически очищенной воде; практическое ознакомление с анаэробным процессом очистки сточных вод.

Порядок выполнения работы. Установить ХПК, концентрацию аммонийного азота и взвешенных веществ в сточных водах. Осуществить биологическую очистку сточных вод в анаэробных условиях. Установить ХПК, концентрацию аммонийного азота, летучих органических кислот и взвешенных веществ, щелочность, окислительно-восстановительный потенциал в биологически очищенной воде.

2.2.1. Установление ХПК окислением бихроматом в кислой среде

Метод предназначен для установления количества кислорода, которое необходимо для окисления органических и неорганических веществ, присутствующих в анализируемой воде. В качестве окислителей применяют бихромат или йодат калия в кислой среде, перманганат калия в кислой или щелочной среде. Считается, что установление ХПК бихроматным методом более точное по сравнению с другими способами из-за наиболее полного окисления органических веществ, особенно если в качестве катализатора окис-

ления в реакционную смесь вводить сульфат серебра. Шестивалентный хром при этом восстанавливается до трехвалентного:

$$Cr_2O_7^{2-} + 14H^+ + 6e \rightarrow 2Cr^{3+} + 7H_2O.$$

Количество восстановленного хрома, которое эквивалентно количеству кислорода, израсходованному на окисление загрязняющих веществ сточных вод, определяют по разнице между количеством бихромата, взятого на анализ, и тем, который остался. Концентрацию бихромата устанавливают титрованием раствором соли Мора.

В арбитражном методе определения ХПК реакционную смесь кипятят в течение 2 ч с обратным холодильником. Для постоянных ежедневных анализов, проводимых для контроля работы очистных сооружений, может использоваться ускоренный метод, при котором отсутствует длительное кипячение. Главная особенность ускоренного метода – повышенная концентрация серной кислоты. Хотя результаты определения получаются несколько ниже по сравнению с арбитражным, но они обычно хорошо воспроизводимы. Рекомендуется периодически проводить определение обоими методами, ускоренным и арбитражным, для нахождения приблизительного коэффициента пересчета.

2.2.1.1. Установление ХПК ускоренным методом.

Приготовление реактивов.

а) 0,25 н. бихромат калия;

б) концентрированная серная кислота;

в) 0,25 н. раствор железисто-сернокислого аммония (соль Мора). В дистиллированной воде растворяют 98 г $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$, добавляют 20 см^3 концентрированной серной кислоты, охлаждают и доводят объем в мерной колбе до 1 дм^3. Титр раствора устанавливают при каждом использовании. В коническую колбу вливают 25 см^3 0,25 н. $K_2Cr_2O_7$, 250 см^3 дистиллированной воды, 20 см^3 концентрированной серной кислоты, смесь охлаждают до комнатной температуры, добавляют 3–4 капли индикатора (см. ниже) и титруют раствором соли Мора. Нормальность N, н., рассчитывают по формуле

$$N = \frac{25 \cdot 0,25}{a},$$

где a – объем 0,25 н. раствора соли Мора, пошедший на титрование, см^3;

г) индикатор – *н*-фенилантраниловая кислота. 0,25 г кислоты растворяют в 12 см^3 0,1 н. раствора едкого натра и разбавляют водой до 250 см^3.

Подготовка пробы. Воду, имеющую ХПК более 1000 мг/дм^3, разбавляют до ХПК ниже 500 мг/дм^3 и на анализ берут 5 см^3. При ХПК воды от 500 до 1000 мг/дм^3 на анализ берут 1 см^3.

Ход анализа. В коническую колбу с притертой пробкой объемом 100 см^3 вливают 1 или 5 см^3 анализируемой пробы, добавляют 2,5 см^3 0,25 н. раствора бихромата калия и при перемешивании вливают струей 15 см^3 концентрированной серной кислоты плотностью 1,84 г/см^3. Реагирующую жидкость, которая имеет температуру около 100°С за счет разбавления кислоты, перемешивают и оставляют на 2 мин. Затем реакционную жидкость охлаждают до комнатной температуры, добавляют 20–30 см^3 дистиллированной воды, 10 капель индикатора и титруют 0,25 н. раствором соли Мора. Аналогично проводят холостой опыт, в котором вместо исследуемой воды берут дистиллированную и осуществляют ее окисление.

Расчет. Показатель ХПК вычисляют по формуле

$$\text{ХПК} = \frac{(a-b)\cdot 2\cdot 1000}{g},$$

где a – объем 0,25 н. раствора соли Мора, израсходованный на титрование в холостом опыте, см^3; b – объем 0,25 н. раствора соли Мора, пошедший на титрование пробы, см^3; 2 – количество кислорода, эквивалентное 1 см^3 0,25 н. раствора соли Мора или бихромата калия, мг; g – объем неразбавленной пробы, взятый на анализ, см^3.

2.2.1.2. Установление ХПК с использованием автоматического измерителя. Автоматический измеритель ХПК, состоящий из блока подготовки проб HI 839800 COD REACTOR и анализатора Multiparameter Bench Photometer, предназначен для прямого потенциометрического экспресс-анализа бихроматной окисляемости природных, технологических, сточных и других вод в диапазоне величин ХПК от 80 до 800 мг/дм^3. Измерение ХПК проводится в соответствии с инструкцией.

Сущность метода заключается в обработке пробы воды бихроматом калия в кислой среде при заданной температуре в присутствии катализатора окисления (концентрированной серной кислоты либо сульфата серебра) и сульфата ртути (II), применяемого

для снижения влияния хлоридов. Численное значение ХПК устанавливается путем измерения экстинкции обработанной реагентами пробы воды при длине волны 600 нм с использованием градуировочной зависимости оптической плотности раствора от значения ХПК.

Подготовка пробы. Отбор проб осуществляют в день проведения анализа. Если проба содержит осадок, видимый невооруженным глазом, взвесь или нерастворенные органические вещества (например, жиры), то перед отбором аликвотной порции пробы воды ее тщательно перемешивают, применяя любое перемешивающее устройство (магнитную мешалку, экстрактор, ультразвуковую ванну).

Подготовка к проведению измерений. В три реакционных сосуда прибора наливают по 5 $см^3$ дистиллированной воды, реакционные сосуды проверяют на отсутствие пузырьков воздуха и измеряют оптическую плотность в них при длине волны 600 нм. При отсутствии разницы оптической плотности более чем на 0,02 единицы они могут быть использованы для проведения измерений, в обратном случае выбирают другие реакционные сосуды.

Приготовление реактивов.

а) раствор серной кислоты концентрацией 1,8 моль/$дм^3$. В стеклянный стакан вместимостью 1000 $см^3$ наливают 180 $см^3$ дистиллированной воды, осторожно разбавляют при перемешивании 20 $см^3$ концентрированной серной кислоты;

б) раствор бихромата калия с концентрацией 0,5 моль/$дм^3$. Бихромат калия высушивают при 105°С в течение 2 ч. Навеску 24,52 г высушенного бихромата калия растворяют в дистиллированной воде в мерной колбе вместимостью 1 $дм^3$ и доводят объем раствора в колбе дистиллированной водой до метки;

в) раствор сульфата ртути (II) в серной кислоте. Растворяют в стеклянной емкости 50 г сульфата ртути (II) в 200 $см^3$ раствора серной кислоты концентрацией 1,8 моль/$дм^3$;

г) реагент для заполнения реакционных сосудов при измерении значений ХПК в диапазоне от 80 до 800 мг/$дм^3$. В реакционный сосуд пипеткой вносят 0,5 $см^3$ раствора бихромата калия концентрацией 0,5 моль/$дм^3$, осторожно добавляют 2,5 $см^3$ концентрированной серной кислоты, затем 0,2 $см^3$ раствора сульфата ртути (II). Смесь осторожно перемешивают вращательными движениями, закрывают сосуд крышкой.

Приготовление градуировочных растворов.

а) основной раствор со значением ХПК 1000 мг/дм^3 готовится на основе органических соединений с известным теоретическим ХПК (щавелевая кислота – 0,18 мг/мг, глюкоза – 1,07 мг/мг, сахароза – 1,12 мг/мг). В мерную колбу вместимостью 100 см^3 вносят 0,0935 г глюкозы и доводят объем жидкости в колбе до метки;

б) градуировочные растворы для диапазона измерений по ХПК от 80 до 800 мг/дм^3. В мерные колбы вместимостью 25 см^3 помещают 2, 5, 10, 20 см^3 основного раствора со значением ХПК 1000 мг/дм^3 и доводят объемы жидкости в колбах до метки. Значения ХПК приготовленных растворов составляют соответственно 80, 200, 400, 800 мг/дм^3. Растворы используют в день приготовления.

Градуировка анализатора проводится в соответствии с инструкцией по эксплуатации с применением градуировочных растворов в зависимости от диапазона измеряемых концентраций. В качестве нулевой пробы используют дистиллированную воду. Градуировочные растворы и нулевую пробу воды подготавливают к измерениям аналогично анализируемым пробам, измеряют значения оптической плотности растворов в реакционных сосудах при соответствующих длинах волн и устанавливают зависимость оптической плотности растворов от значений ХПК. Градуировочную характеристику признают стабильной, если коэффициент корреляции зависимости не менее 0,98, в обратном случае градуировку повторяют.

Порядок проведения измерений. Одновременно анализируют не менее двух аликвотных порций пробы воды (параллельных проб) объемом 2 см^3. Заполняют реакционные сосуды реагентом, проводят визуальный осмотр реакционных сосудов и его содержимого: при обнаружении в сосуде трещин или признаков зеленой окраски раствора реакционный сосуд не используют. Включают нагреватель блока подготовки проб, нагревают его до 150°С и выдерживают при этой температуре не менее 10 мин. Снимают крышку реакционного сосуда и сразу же вносят в него 2 см^3 анализируемой воды, при необходимости тщательно перемешанной. На реакционный сосуд плотно навинчивают крышку и перемешивают его содержимое, осторожно переворачивая несколько раз. Вытирают внешнюю поверхность реакционного сосуда фильтровальной бумагой, помещают его в нагревательный блок и выдерживают в течение 2 ч.

Осторожно, специальными захватами вынимают реакционные сосуды из нагревательного блока и охлаждают при комнатной температуре до температуры не выше 60°С. Перемешивают содержимое, поворачивая реакционные сосуды. Реакционные сосуды охлаждают до комнатной температуры. Реакционные сосуды, в которых произошло визуальное уменьшение объема содержимого, для измерений не используют, анализ воды повторяют.

Измерения проводят в режиме 9 («ХПК в среднем диапазоне»). В измерительную ячейку анализатора устанавливают реакционный сосуд, заполненный дистиллированной водой, нажимают кнопку ZERO, при этом значение оптической плотности обнуляется. Затем в измерительную ячейку анализатора помещают реакционный сосуд с подготовленной прозрачной пробой и производят измерение при рабочей длине волны. Если раствор мутный, то ему дают отстояться, затем измеряют его оптическую плотность. Если раствор после отстаивания остается мутным, то анализ пробы повторяют, предварительно разбавив ее дистиллированной водой.

Обработка результатов измерений. По значению оптической плотности раствора для каждой аликвотной пробы воды, используя градуировочную зависимость, определяют значение ХПК. Если значение ХПК выходит за пределы диапазона построения градуировочной зависимости, то испытания повторяют, либо разбавив пробу дистиллированной водой, либо используя реагент для работы с другим диапазоном значений ХПК, учитывая степень разбавления при расчетах. За результат измерения принимают среднеарифметическое значение не менее двух параллельных определений ХПК пробы воды при условии расхождения между ними менее 1%.

2.2.2. Установление концентрации аммонийного азота

Метод основан на отгонке аммиака, который присутствует в сточных водах как в свободном виде, так и в виде ионов аммония. Использование свободной щелочи недопустимо при анализе сточных вод, содержащих белковые и другие вещества, которые в этих условиях разлагаются с выделением аммиака. Если сточные воды содержат относительно высокие концентрации фенолов, требуется более сильное подщелачивание для связывания фенолов, поэтому вместо фосфатного буферного раствора наливают 20 $см^3$ 40%-ного раствора гидроксида натрия. Если в значительном количестве

присутствуют и те и другие вещества, отгонку проводят дважды: сначала при pH 7,4, затем из более щелочной среды. При наличии в пробе сульфид-ионов перед отгонкой добавляют немного карбоната свинца.

Приготовление реактивов.

а) дистиллированная вода, не содержащая аммонийных солей и аммиака. Дистиллированную воду подкисляют, прибавляют к ней перманганат калия и перегоняют либо пропускают ее через слой катионита;

б) фосфатный буферный раствор. Растворяют в дистиллированной воде, не содержащей аммонийных солей и аммиака, 14,3 г безводного KH_2PO_4 и 68,8 г безводного K_2HPO_4 и разбавляют раствор такой же водой до 1 $дм^3$;

в) 0,01 н. раствор серной кислоты;

г) 0,01 н. раствор гидроксида натрия;

д) индикатор – метиловый красный. Растворяют в 7,4 $см^3$ 0,05 н. раствора гидроксида натрия 0,1 г метилового красного и разбавляют раствор до 100 $см^3$ дистиллированной водой.

Ход анализа. В круглодонную колбу для перегонки емкостью 1 $дм^3$ помещают 50 или 100 $см^3$ анализируемой сточной воды, нейтрализованной до pH 7 (необходимое для нейтрализации количество кислоты или щелочи определяют титрованием другой порции сточной воды), приливают 25 $см^3$ фосфатного буферного раствора, разбавляют до 400 $см^3$ безаммиачной дистиллированной водой. В приемник помещают 25 $см^3$ 0,01 н. раствора серной кислоты. Сразу же включают колбу в собранную установку для отгонки, осторожно вращая, перемешивают в ней жидкость и начинают нагревание. Конец трубки холодильника должен быть погружен в раствор серной кислоты, находящийся в приемнике. Отгоняют 250 $см^3$ жидкости, затем отсоединяют приемник, отгон титруют рабочим раствором гидроксида натрия в присутствии четырех капель метилового красного до перехода окраски от красной до желтой.

Проводят холостой опыт со всеми примененными в анализе реактивами. Для более точного определения окончания титрования используют сравнение цвета титруемой жидкости с цветом «свидетеля». «Свидетелем» служит цвет раствора, приготовленного из 50 $см^3$ 0,01 н. раствора серной кислоты и дистиллированной воды, взятой в объеме собранного конденсата, после добавления четырех капель смешанного индикатора.

Расчет. Содержание аммонийных ионов и аммиака в расчете на ион аммония X, мг/дм^3, находят по формуле

$$X = \frac{(a-b)\cdot K \cdot 0{,}18 \cdot 1000}{V},$$

где a – объем 0,01 н. раствора гидроксида натрия, израсходованный на титрование пробы, см^3; b – объем того же раствора, пошедший на титрование в холостом опыте, см^3; K – поправочный коэффициент для приведения концентрации раствора серной кислоты к точно 0,01 н.; 0,18 – количество ионов NH_4^+, эквивалентное 1 см^3 точно 0,01 н. раствора серной кислоты, мг; V – объем сточной воды, взятой для анализа, см^3.

2.2.3. Установление концентрации взвешенных веществ

Для определения концентрации взвешенных органических и неорганических веществ в пробе воды используется метод, основанный на выделении взвешенных веществ фильтрованием и установлении их количества взвешиванием после высушивания до полного удаления влаги при 105°С. Содержание минеральных веществ в осадке определяют после его озоления, а количество органических веществ – по разнице между количеством сухих веществ и пепла.

Ход анализа. 1 дм^3 анализируемой воды фильтруют на воронке под вакуумом через плотный фильтр, который предварительно высушивают (не сгибая) до полного удаления влаги при 105°С. Фильтр с осадком складывают, переносят в сухой взвешенный бюкс и сушат в сушильном шкафу при 105°С до полного удаления влаги. Высушивание считают законченным, если расхождение между двумя взвешиваниями не превышает 0,0003 г.

Потом фильтр с осадком перекладывают в тигель, сжигают его на электроплитке под тягой и для озоления ставят в муфельную печь при 600°С. Во время сжигания наблюдают за изменением цвета осадка. При большом количестве органических веществ осадок сначала становится черным, иногда появляется запах жженых перьев, а при незначительном количестве органических веществ осадок сначала буреет. Если органических веществ в осадке нет, то он сразу становится белым. Выделение бурого пара в первые минуты сжигания осадка наблюдается при высоком содержании солей азотной кислоты. После озоления тигель вынимают

из печи с использованием специальных щипцов, охлаждают в эксикаторе, взвешивают и снова ставят в печь. Через 1 ч сжигания взвешивание повторяют. Сжигание продолжают до тех пор, пока разница между двумя последними взвешиваниями будет составлять не более 0,0003 г.

Расчет. Количество миллиграммов осадка после сушки при 105°С – это и есть содержание абсолютно сухих взвешенных веществ в 1 дм^3 анализируемой пробы. Состав взвешенных веществ характеризуют процентным содержанием органических и неорганических веществ, которые рассчитывают по следующим формулам:

$$X_{\text{н}} = \frac{a \cdot 100}{c},$$

$$X_{\text{о}} = 100 - X_{\text{н}},$$

где $X_{\text{н}}$ – содержание неорганических веществ в абсолютно сухих взвешенных веществах, %; a – количество пепла, г; c – количество абсолютно сухих веществ, г; $X_{\text{о}}$ – содержание органических веществ в абсолютно сухих взвешенных веществах, %.

2.2.4. Очистка сточных вод в анаэробных условиях

2.2.4.1. Периодический режим. Перед очисткой измеряют величину ХПК сточных вод и при необходимости проводят корректировку до значения pH 7. 450 см^3 нейтрализованной воды и 50 см^3 анаэробного активного ила помещают в реактор объемом 500 см^3, оснащенный газоотводной трубкой. Трубку опускают в склянку с водой. Реактор ставят в термостат при температуре 30°С на 7–14 сут.

После очистки устанавливают содержание органических и минеральных веществ в сухих веществах активного ила, ХПК, окислительно-восстановительный потенциал, концентрацию аммонийного азота, взвешенных веществ, летучих органических кислот и щелочность в биологически очищенной воде.

2.2.4.2. Непрерывный режим. В лабораторный биореактор колонного типа объемом 1,8 дм^3 помещают волокнистый носитель в количестве 20–30 г (плотность упаковки 15–20 г/дм^3). Носитель закрепляют в биореакторе в виде жгутов с линейным расположением волокна по высоте аппарата. В биореакторе предусмотрена циркуляция жидкости через аппарат по замкнутому контуру: приемник сточных вод – дозирующий циркуляционный насос – биореактор – приемник (рисунок).

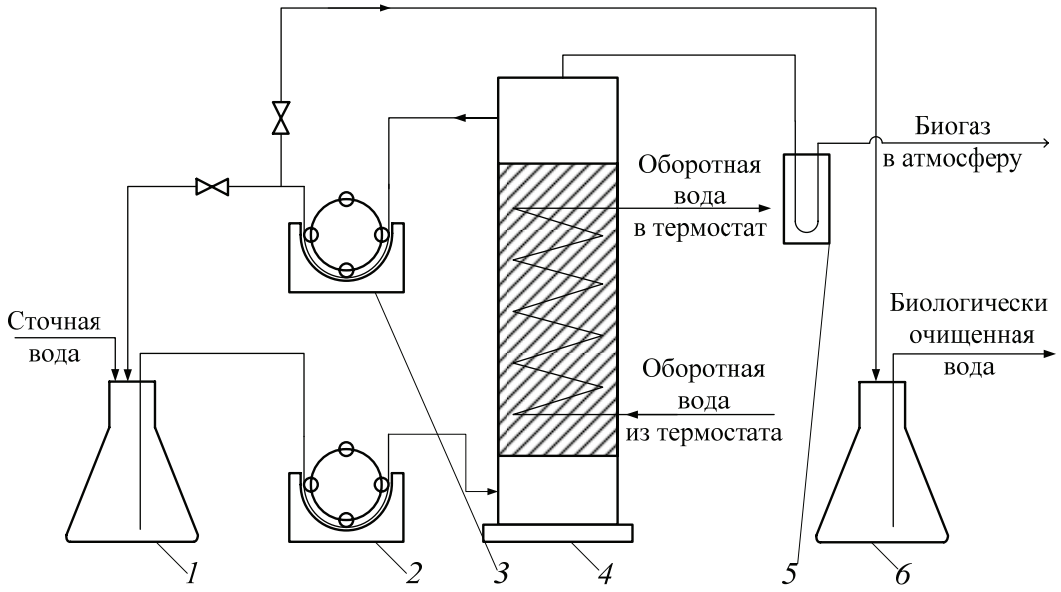


Схема очистки сточных вод:
1 – приемник сточных вод; *2*, *3* – дозирующие насосы; *4* – биореактор; *5* – гидрозатвор; *6* – приемник биологически очищенной воды

Для накопления микроорганизмов-деструкторов в естественных условиях и иммобилизации их на носителе сточные воды (pH 6,5–7,0) рециркулируют через термостатированный (30°C) биореактор, который заполнен носителем, в течение 24–48 ч, а потом переводят биореактор на непрерывный проток жидкости (скорость протока 0,01–0,05 $ч^{-1}$). Процесс заканчивают после достижения стабильного уровня показателей загрязненности биологически очищенной воды при заданном протоке жидкости (время стабилизации процесса 7–10 сут).

2.2.5. Определение концентрации летучих органических кислот в биологически очищенной воде

Для подготовки пробы к анализу ее центрифугируют при 15 000 $мин^{-1}$ на протяжении 15 мин, затем фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм.

Определение проводят на газожидкостном хроматографе Agilent 7820A с использованием кварцевой капиллярной сильнополярной колонки длиной 60 м, диаметром 535 мкм и толщиной слоя сорбента 1 мкм (сорбент – слой поперечно-связанного молекулярно-сшитого полимера полиэтиленгликоля, модифицированного нитротерефталевой кислотой). Газ-носитель – азот с расходом 115 $см^3$/мин. Программа работы термостата: 100°C (выдержка 5 мин) → 130°C

(со скоростью 2°С/мин) → продувка при 230°С (15 мин). Температура пламенно-ионизационного детектора – 300°С, температура испарителя – 250°С. Объем вводимой пробы – 0,3 мкл, деление потока – 10 : 1.

Подготовленную пробу переносят в хроматографический флакон, устанавливают в гнездо автоматического пробоотборника и выполняют анализ.

Для качественного и количественного обнаружения органических кислот с длиной цепи 1–4 атома углерода из сложной смеси органических веществ, содержащихся в сточной воде, необходима предварительная калибровка по анализируемым соединениям. Качественная калибровка выполняется по методу метки, основанному на экспериментальном определении времени удерживания эталонного и анализируемого веществ. Равенство времени удерживания позволяет идентифицировать компоненты смеси. Количественное определение анализируемого вещества осуществляется по площади пика этого же вещества в эталонном растворе, согласно калибровке. Анализируется содержание муравьиной, уксусной, пропионовой и бутановой кислот.

2.2.6. Щелочность

Щелочностью называется содержание в воде веществ, вступающих в реакцию с сильными кислотами, т. е. с ионами водорода. В содержимом биореактора естественная щелочность обусловлена в основном присутствием ионов аммония и других ионов (CO_3^{2-}, S^{2-}, PO_4^{3-}, анионов летучих и нелетучих слабых кислот). Кроме того, на буферность системы также влияют ионы минеральных солей, вносимых при эксплуатации промышленных анаэробных биореакторов для регулирования pH.

Поскольку многие из перечисленных выше анионов могут быть определены отдельными специальными методами, то вычитая их содержание из общего содержания ионов, входящих в ту или иную группу, можно при не слишком сложном составе сточной воды более или менее точно вычислить содержание ионов, для которых специальные методы определения отсутствуют.

Приготовление реактивов.

а) 0,1 н. раствор соляной или серной кислоты;

б) индикатор – фенолфталеин. Растворяют 1 г фенолфталеина в этиловом спирте и разбавляют раствор до 100 $см^3$ этим же растворителем;

в) индикатор – бромфеноловый синий. Растворяют 0,1 г бромфенолового синего в 20%-ном растворе этилового спирта и разбавляют раствор до 100 см^3 этим же растворителем.

Ход анализа. Если вода мутная, ее надо профильтровать, если окрашенная – разбавить дистиллированной водой. Разбавление проводят в мерных колбах емкостью 100 или 200 см^3. Сначала наливают в мерную колбу 20–30 см^3 дистиллированной воды, потом точно отмеренный объем анализируемой воды, раствор перемешивают, убеждаются в отсутствии заметной окраски разбавленной пробы, доливают дистиллированную воду до метки.

В коническую колбу для титрования помещают 100 см^3 подготовленной воды, приливают 5 капель индикатора фенолфталеина и содержимое колбы титруют на белом фоне 0,1 н. раствором соляной или серной кислоты до исчезновения розовой окраски. Израсходованное количество кислоты соответствует щелочности воды по фенолфталеину, т. е. содержанию гидроксил-ионов и анионов, обусловливающих в результате гидролиза в водном растворе pH > 8,4 (OH^-, CO_3^{2-} (титруется до HCO_3^-), S^{2-} (титруется до HS^-), PO_4^{3-} (титруется до HPO_4^{2-}) и др.).

В эту же колбу к оттитрованной по фенолфталеину воде приливают 5–6 капель индикатора бромфенолового синего, в другую колбу наливают такой же объем подготовленной воды и столько же индикатора бромфенолового синего, сколько было введено в первую колбу. Ставят обе колбы на белую бумагу и титруют жидкость в первой колбе кислотой до тех пор, пока цвет ее не станет отличаться от цвета жидкости во второй колбе. Количество кислоты, пошедшее на второе титрование, показывает содержание в воде слабых оснований и анионов относительно более сильных кислот, показывающих в водном растворе pH ≤ 8,4 (NH_4^+, HCO_3^- (титруется до H_2CO_3), HS^- (титруется до H_2S), HPO_4^{2-} (титруется до $H_2PO_4^-$) и др.). Суммарное количество израсходованного на два титрования раствора кислоты характеризует общую щелочность анализируемой воды.

Расчет. Щелочность Щ, мг-экв/дм^3, по результатам двух титрований пересчитывают на 1 дм^3 анализируемой воды:

$$Щ = \frac{V \cdot c \cdot M}{1000 \cdot V_{пр}},$$

где V – объем раствора кислоты, пошедшего на титрование, см^3; c – концентрация раствора кислоты, моль экв/дм^3; M – молярная масса иона, на который пересчитывается щелочность раствора, мг/моль экв; 1000 – пересчет объема раствора кислоты из кубических сантиметров (см^3) в кубические дециметры (дм^3); $V_{пр}$ – объем неразбавленной пробы воды, взятой на анализ, дм^3.

Результат первого титрования для стабильно работающей системы анаэробного биореактора (рабочий pH около 7) равен нулю. По результатам второго титрования, зная содержание ионов аммония в анализируемой жидкости (см. п. 2.2.2), можно установить суммарное содержание карбоксил-, сульфид-ионов и других, определяемых в этой группе.

2.2.7. Определение окислительно-восстановительного потенциала (ОВП)

Величина ОВП характеризует преимущественно протекающий в системе биохимический процесс. Определение проводят с использованием pH-метра с милливольт-шкалой либо мультиметра. Электроды прибора погружают в содержимое биореактора и выдерживают до прекращения изменения показаний прибора.

3 СОСТАВ И СВОЙСТВА АКТИВНОГО ИЛА

Активный ил (АИ) – сложный биоценоз, в состав которого входят организмы разных систематических групп. Для каждого очистного сооружения он имеет свои характерные особенности. Организмы ила обладают способностью реагировать на состав и свойства очищаемых сточных вод, а также на условия жизнеобеспечения, зависящие от конструкции и технологического режима эксплуатации сооружений. При этом изменяется состояние организмов, состав биоценоза и количественное распределение отдельных групп.

Для контроля качества очистки сточных вод на очистных сооружениях измеряют целый комплекс гидрохимических показателей. Однако даже при аварийных сбросах ухудшение этих показателей фиксируется с запаздыванием. Это связано с тем, что при разрушении хлопков и бактериальных клеток биохимическое окисление загрязняющих веществ некоторое время еще продолжается за счет ферментов, вышедших из клеток в иловую смесь. Только после исчерпания этих возможностей эффективность очистки резко ухудшается. Наиболее быстро меняется только прозрачность надиловой воды, которая резко падает при разрушении хлопков ила.

В то же время перестройка биоценоза АИ в результате внешних воздействий происходит в течение всего лишь нескольких часов и может быть легко замечена гидробиологом. При этом важно регистрировать не только качественные изменения, так как в состав биоценоза входит значительное число организмов с высокой экологической пластичностью (*Aspidisca costata*, *Rotaria rotatoria*, *Arcella vulgaris*, голые амебы, инфузории родов *Vorticella*, *Opercularia* и др.). Обязательно необходим также количественный учет всех групп организмов.

Своевременная регистрация происходящих в биоценозе изменений позволяет оперативно выявлять неблагоприятные факторы, воздействующие на процесс биологической очистки сточных вод, что важно для эффективного управления процессом.

3.1. Трофические взаимоотношения в биоценозе активного ила

В активном иле присутствуют все основные физиологические группы микроорганизмов, обеспечивающие разложение соединений углерода, азота, фосфора, серы и других элементов. Особенностью ила является отсутствие в нем первичных продуцентов (за исключением хемоавтотрофных бактерий), поскольку органические вещества поступают со сточными водами.

Сложная экологическая система АИ включает организмы, которые находятся на разных трофических уровнях. Для правильной оценки биоценоза ила необходимо охарактеризовать состояние как бактериальных популяций, так и простейших и многоклеточных организмов, составляющих приблизительно 5–10% от общей биомассы.

Первый трофический уровень формируют гетеротрофные бактерии, водоросли, сапротрофные грибы и сапротрофные простейшие.

При сапротрофном способе питания пищей могут служить только растворенные органические соединения. Питательные вещества поступают в организм путем осмоса через поверхность тела. Такой способ питания характерен для бактерий и сапрозойных простейших.

Основная роль в процессах деградации загрязняющих веществ в аэротенках принадлежит гетеротрофным флокулообразующим бактериям. Эти организмы объединены биополимерным гелем в хорошо защищенное и организованное структурно-функциональное целое – хлопок активного ила. Популяции флокулообразующих бактерий составляют в иле 90–95%, и их состояние определяет эффективность биохимического окисления загрязняющих веществ.

Осмотрофные простейшие также принимают участие в процессе окисления. Однако бактерии по сравнению с ними имеют

несомненные преимущества в борьбе за потребляемый субстрат: наименьший размер клеток, большая удельная поверхность, гораздо меньшее время генерации. Поэтому роль простейших усиливается только в случае гибели или угнетения флокулообразующих бактерий либо при изобилии органических веществ и снижении конкуренции за субстрат.

Такая ситуация наблюдается в первые недели пуска аэротенков при избытке питательных веществ: сапрозойные простейшие развиваются вместе с бактериями, однако в дальнейшем они начинают вытесняться. В обычных условиях эксплуатации сооружений периодическое повышение численности сапрозойных простейших (например, жгутиконосцев) в биоценозе ила свидетельствует об угнетении звена флокулообразующих бактерий.

Второй трофический уровень представлен голозойными простейшими.

С течением времени из среды извлекается все больше растворенных загрязнений и появляется избыточное количество бактерий. Это создает предпосылки для появления организмов с голозойным типом питания, которые получают питательные вещества, поглощая цитоплазму других организмов. Одними из первых появляются мелкие жгутиконосцы рода *Bodo*. Захват твердой пищи они осуществляют при помощи органов движения – жгутиков, которые подгоняют пищу (бактерии, коллоидные частицы и т. д.) к участку цитоплазмы, расположенному у основания жгутика. Далее пищевые частицы поступают в пищеварительную вакуоль, где и происходит их усвоение.

Ресничные инфузории и саркодовые также обладают голозойным типом питания. Голые амебы образуют псевдоподии и захватывают пищу путем фагоцитоза. Исключение составляют некоторые роды голых амеб с пиноцитозным способом питания: растворенные вещества поглощаются ими прерывисто через определенные участки клеточной мембраны, а не непрерывно через всю поверхность тела, как у сапрозойных организмов. Раковинные амебы захватывают пищу длинными псевдоподиями и питаются главным образом бактериями, жгутиковыми и даже инфузориями.

У голозойно питающихся инфузорий имеется ротовое отверстие, глоточный канал, пища по которому подгоняется ресничками. Инфузории питаются бактериями, детритом, а также простейшими.

Третий трофический уровень представляют хищные организмы – отдельные виды малощетинковых червей, хищные коловратки, сосущие инфузории, тихоходки, хищные грибы.

У сосущих инфузорий ротовой аппарат вторично редуцирован и заменен сосательными щупальцами, при помощи которых они высасывают жидкую эндоплазму жертвы, предварительно оказывая на добычу парализующее действие.

Коловратки питаются бактериями, детритом, а хищные виды – различными простейшими. Пищу они усваивают при помощи сложной пищеварительной системы, состоящей из глотки с жевательным аппаратом, пищеводом, желудком и т. д. Нематоды также обладают хорошо развитой пищеварительной системой, но питаются в основном иловыми частицами, способствуя минерализации активного ила.

Способ питания организмов активного ила определяет их структурное положение в биоценозе и характер взаимоотношений.

3.2. Отклик биоценоза активного ила на внешнее воздействие

Каждый тип биоценоза АИ, развивающийся в очистном сооружении, достаточно стабилен и имеет характерные особенности. Однако под влиянием различных факторов биоценоз может изменяться, при этом может происходить как его усложнение, так и упрощение. В зависимости от интенсивности внешнего воздействия отклик биоценоза выражается в виде флуктуаций и сукцессий.

Флуктуации – краткосрочные незначительные изменения, постоянно происходящие в процессе функционирования АИ. Они происходят под влиянием неблагоприятных факторов, не превышающих порога допустимого воздействия. При этом биоценоз сохраняет способность к самопроизвольному восстановлению под действием механизмов гомеостаза, его тип сохраняется, а скорость и эффективность биохимического окисления загрязнений поддерживаются на определенном уровне.

Резкие или значительные изменения нагрузки на ил по органическим загрязняющим веществам, аварийные сбросы, вывод сооружений из стабильного рабочего режима и т. п. приводят к сукцессиям.

Сукцессия – последовательная замена одного биоценоза другим под влиянием изменения экологических условий обитания. При переходе от одной фазы сукцессии к другой биоценоз претерпевает значительные изменения, что сопровождается его заметной структурной перестройкой, снижением или повышением функциональной активности. Эти изменения в большинстве случаев долгосрочны и приводят к образованию новой модификации ила, наиболее полно отражающей экологические условия, в которых он находится.

Различают первичные и вторичные, прямые и обратные сукцессии.

Первичная сукцессия наблюдается во время запуска очистных сооружений при наращивании активного ила.

Вторичная сукцессия происходит при восстановлении нарушенного биоценоза в результате аварии на сооружениях, когда активный ил разрушается, но не полностью (гибнут только чувствительные виды, а устойчивые сохраняются).

Однако при экстремальном неблагоприятном воздействии может происходить полное разрушение биоценоза (гибнет практически все население АИ). В этом случае восстановление протекает по механизму первичной сукцессии.

Прямая сукцессия – последовательное улучшение, совершенствование биоценоза, увеличение видового разнообразия. При прямых сукцессиях биоценоз усложняется, возрастает его устойчивость к неблагоприятным факторам. В него включаются все более совершенные виды в соответствии со следующей последовательностью: дисперсные бактерии > зооглеи > нитчатые бактерии > бактерии в хлопках ила > сапротрофные грибы > мелкие жгутиконосцы > мелкие голые амебы > мелкие раковинные амебы > крупные раковинные амебы > свободноплавающие инфузории > брюхоресничные инфузории > коловратки > нематоды > прикрепленные инфузории > малощетинковыс черви > брюхоресничные черви > сосущие инфузории > тихоходки > хищные коловратки > хищные грибы > водные клещи > другие представители третьего трофического уровня.

Обратная сукцессия – упрощение биоценоза, нарушение его структурной целостности, сокращение разнообразия с увеличением численности устойчивых к неблагоприятным факторам видов. При обратных сукцессиях формируется сообщество с более

низким уровнем организации, обеспечивающее худшее качество биологической очистки, но наиболее устойчивое к данным экологическим условиям.

3.3. Уровень развития биоценоза и его деструкционный потенциал

На уровень развития биоценоза и его деструкционный потенциал (способность ила к биохимическому окислению органических загрязняющих веществ и нитрификации) влияют следующие основные показатели:

– состав сточных вод (трофность, содержание биогенных элементов, присутствие токсичных веществ);

– конструкция очистных сооружений;

– режим их эксплуатации.

Различают три основных типа биоценозов: с низким, средним и высоким деструкционным потенциалом. Однако из-за многофакторности условий развития экосистемы кроме основных имеется ряд переходных типов биоценозов с характерными структурными и физиологическими особенностями.

Тип 1. АИ с низким деструкционным потенциалом. Работает на неполное окисление органических загрязняющих веществ. Снижение уровня загрязненности сточных вод по $БПК_{полн}$ не превышает 90%. В биотопе преобладают восстановительные процессы. Окислительная мощность аэротенков составляет 1,1–1,5 кг/($м^3$ · сут). Для таких сооружений характерны высокие удельные нагрузки (400–600 мг БПК на 1 г АИ). Экологические условия соответствуют полисапробной зоне водоема (значение $БПК_5$ – около 40 мг/$дм^3$).

Численность бактерий в хлопках ила близка к максимальной, присутствует *Zoogloea ramigera*. Наблюдается бедное видовое разнообразие простейших (5–13 видов). Для биоценоза характерно численное преобладание отдельных групп, таких как мелкие жгутиконосцы, мелкие раковинные амебы, крупные свободноплавающие инфузории (доминируют роды *Colpidium* и *Paramecium*). Хищники полностью отсутствуют. Прикрепленные инфузории встречаются редко (как правило, *Vorticella microstoma*). Среди

брюхоресничных инфузорий наблюдается в основном *Aspidisca costata*. Все встречающиеся виды обладают широкой экологической пластичностью.

Такой биоценоз характеризуется низкой устойчивостью к неблагоприятным факторам, в нем наблюдаются значительные колебания численности популяций. Так, нарушение баланса сорбции и окисления при перегрузках ила по органическим загрязняющим веществам часто приводит к чрезмерному развитию нитчатых организмов.

Нитрификация в активном иле с низким деструкционным потенциалом отмечается редко из-за неполного окисления органических веществ.

Хлопки ила достаточно сформированы, крупные, плотные.

Тип 2. АИ со средним деструкционным потенциалом. Обеспечивает полное окисление растворенных органических веществ. Наиболее распространен на сооружениях, очищающих сточные воды комбинированного состава (40–50% бытовых, 50–60% производственных). Окислительная мощность сооружений составляет 0,30–1,09 кг/($м^3$ · сут). Удельные нагрузки на активный ил по органическим загрязняющим веществам – 150–500 мг/г (чаще 250–300 мг/г). Экологические условия соответствуют α- и β-мезосапробным зонам водоема (значение $БПК_5$ – 4–12 и 1,7–4,0 мг/$дм^3$ соответственно).

Биоценоз разнообразен, численность видов простейших и многоклеточных организмов составляет в среднем от 14 до 25. При нормально протекающем процессе очистки в них отсутствуют численно доминирующие виды или такое доминирование минимально. Биоценоз динамичен, подвижен и чутко реагирует на внешнее воздействие.

С повышением содержания растворенных органических загрязняющих веществ нарушается баланс между их сорбцией и окислением, и биоценоз деградирует. При этом увеличивается численность бактерий, не связанных с хлопками АИ, и нитчатых организмов, а численность флокулообразующих бактерий снижается. Одновременно сокращается видовое разнообразие простейших, растет численность устойчивых видов (бесцветных жгутиконосцев, раковинных амеб).

В активном иле преобладают свободноплавающие инфузории, прикрепленные формы инфузорий представлены экологически

пластичными видами (устойчивы к высоким содержаниям растворенных органических веществ, недостатку кислорода и т. д.), присутствуют коловратки, толерантные к неблагоприятным условиям, черви.

Нитрификация в АИ со средним деструкционным потенциалом, как правило, удовлетворительная, а в летний период значительно развивается (содержание нитратов в очищенных водах более 20 мг/дм^3). Численность хищников связана с наличием и интенсивностью процесса нитрификации и при его подавлении снижается.

Переход от биоценоза со средним деструкционным потенциалом к высокому сопровождается следующими закономерностями: улучшение флокулирующих свойств АИ и его способности к седиментации, усложнение структуры и насыщение видами при отсутствии численного преобладания отдельных видов, повышение стабильности биоценоза и его устойчивости к неблагоприятным факторам, увеличение ферментативной активности ила, что в целом обеспечивает высокое качество очистки.

Тип 3. АИ с высоким деструкционным потенциалом. Окислительная мощность аэротенков – 0,01–0,29 кг/(м^3 · сут). Экологические условия соответствуют β-мезосапробной зоне водоема (значение $БПК_5$ – 1,7–4,0 мг/дм^3).

Формируется наиболее экологически совершенный биоценоз – нитрифицирующий активный ил, который обеспечивает полное окисление загрязнений при низких нагрузках (80–150 мг/г).

Хлопки такого ила крупные, компактные, хорошо оседающие. После отстаивания в лабораторном цилиндре наблюдается их самопроизвольная флотация, вызванная процессами денитрификации.

Биоценоз нитрифицирующего ила характеризуется наиболее сложной экологической структурой с высоким таксономическим разнообразием (до 45 видов простейших) без численного преобладания отдельных видов. Нитчатые бактерии, мелкие бесцветные жгутиконосцы, мелкие формы как голых, так и раковинных амеб практически полностью вытесняются из биоценоза или их численность минимальна. Из инфузорий преобладают брюхоресничные и прикрепленные формы, жизнедеятельность которых тесно связана с хорошо сформированными хлопками ила. Подкласс *Peritricha* представлен богатым разнообразием одиночных (*Vorticella*), колониальных (*Epistylis*, *Zoothamnium*, *Opercularia*, *Carchesium*) родов. Разнообразна фауна раковинных бентосных амеб (роды *Arcella*, *Centropyxis*, *Difflugia*, *Euglypha*). Присутствуют представители

высшего звена – хищные коловратки, сосущие инфузории, хищные грибы и черви рода *Chaetogaster*. Периодически встречаются тихоходки.

АИ с высоким деструкционным потенциалом за счет богатого видового разнообразия более устойчив к неблагоприятным воздействиям. Например, при поступлении концентрированных производственных сточных вод биоценоз сохраняет свою структурную целостность и удовлетворительный уровень ферментативного окисления. Разрушение такого биоценоза возможно только при чрезвычайном воздействии: резком возрастании удельной нагрузки на активный ил, поступлении сильно токсичных сточных вод при аварийных сбросах, дефиците и дисбалансе питательных веществ.

3.4. Структура и свойства хлопков активного ила

Наиболее важной характеристикой АИ является способность к образованию хлопков, от которой зависят скорость и полнота осаждения ила, его влагоотдающие свойства. Размеры и структура хлопков изменчивы и обусловлены множеством факторов. Ил, очищающий высококонцентрированные сточные воды, состоит из мелких, легких хлопков. С понижением концентрации загрязняющих веществ хлопки увеличиваются в размерах. Оптимальной считается структура ила с хлопками среднего размера, имеющими большую поверхность для сорбции загрязнений, и в то же время достаточно тяжелыми, чтобы оседать во вторичных отстойниках и не выноситься токами воды в водоем.

Флокуляционные свойства ила тесно связаны с сукцессионной перестройкой в активном иле по мере изменения удельных нагрузок.

При устойчивых нагрузках и прочих благоприятных условиях масса АИ представляет собой хлопки размером от 50–200 мкм. Средняя плотность ила составляет 1,10–1,37 г/см^3. Хлопки активно сорбируют питательные вещества, что способствует развитию бактерий именно в их составе, в то время как свободных (диспергированных) бактерий в таком иле практически нет. На поверхности хлопков может находиться незначительное количество слабо связанных с ними одиночных бактерий. Хлопки ила крупные,

компактные, хорошо осаждаются во вторичных отстойниках, увлекая за собой мелкие хлопья, что способствует повышению качества очищенных вод. В биоценозе высока численность организмов, непосредственно связанных с хлопками, – брюхоресничных инфузорий, прикрепленных инфузорий, нематод, коловраток и т. д.

В неблагоприятных условиях (при перегрузках по органическим веществам, поступлении токсичных сточных вод, различных нарушениях технологического режима очистки) возрастает число диспергированных бактерий, а следовательно, и бактериофагов – свободноплавающих инфузорий, мелких раковинных амеб, некоторых видов жгутиконосцев, а также осмотрофно питающихся простейших, которые занимают ниши погибших флокулообразующих бактерий. Хлопки разрушаются, измельчаются, легко выносятся из отстойников, в результате трудно поддерживать необходимую дозу циркуляционного ила, обеспечивать необходимый возраст активного ила.

Наиболее распространены следующие формы нарушения процесса хлопьеобразования.

Диспергирование хлопков. Хлопки имеют размер 50–100 мкм, компактные, сферические, но недостаточно прочные и легко разрушаются. При отстаивании в цилиндре большие хлопки быстро осаждаются, но в надиловой воде присутствует много мелких диспергированных частиц ила.

Причины: низкая концентрация растворенного кислорода в иловой смеси, недостаточное перемешивание, поступление токсикантов, резкие изменения значения pH и температуры.

Микрофлокуляция хлопков. Хлопки достигают размера не более 10–20 мкм, не агрегируют и не укрупняются.

Причины: наличие в сточных водах токсичных веществ, подавляющих процесс гелеобразования (характерно для целлюлозобумажного, фармацевтического, химического производств), низкие нагрузки на ил («голодающий» ил), разрушение хлопков высокоскоростными механическими аэраторами, мощными насосами и т. д.

Флотация хлопков. При отстаивании в цилиндре наблюдаются две фазы. Сначала АИ быстро осаждается, хорошо уплотняется и образуется прозрачная надиловая вода. Однако после 1,0–1,5 ч отстаивания ил наполняется пузырьками газа и всплывает. В отстойниках всплывающий ил имеет вид крупных хлопьев с черными краями.

Причина: образование газообразного азота в хлопках на дне отстойников в результате протекания процесса денитрификации.

Гелевое вспухание ила. Наблюдается при избыточном образовании геля флокулообразующими бактериями.

Причина: высокое содержание в сточных водах загрязняющих веществ, устойчивых к биохимическому окислению.

Нитчатое вспухание ила. Обусловлено угнетением и гибелью флокулообразующих бактерий вследствие резкого увеличения численности организмов с нитчатой структурой (хламидобактерий, цианобактерий и мицелиальных грибов). При этом объем ила значительно увеличивается при сохранении или даже сокращении биомассы.

Причины: перегрузка активного ила по органическим веществам, наличие в сточных водах токсичных соединений, недостаток или избыток биогенных элементов, высокое содержание соединений серы, пониженное значение pH (менее 5) и др.

Пенообразование. В аэротенках возникает из-за повышенного содержания моющих средств в очищаемых сточных водах и низкой дозы АИ по массе. Во вторичных отстойниках (возможно и в аэротенках) может происходить при развитии в иле актиномицетов.

3.5. Признаки ухудшения экологических условий функционирования активного ила

Состояние биоценоза АИ при гидробиологическом анализе позволяет оперативно выявить наиболее часто встречающиеся нарушения условий его функционирования.

Признаки дефицита кислорода в иловой смеси. При возрастании нагрузок на ил, воздействии токсичных сточных вод резко увеличивается поглощаемость кислорода иловой смесью. При исследовании легко выявляются признаки угнетения организмов: снижается активность простейших (например, встречаются инфузории рода *Opercularia* с замкнутым ресничным диском), у инфузорий расширяются сократительные вакуоли, у ротового отверстия раздуваются газовые тары (особенно у рода *Peritricha*), коловратки становятся неподвижными, застывают в вытянутом состоянии или сжимаются, быстро погибают.

Наблюдаются также структурные изменения, характеризующие дефицит кислорода в иловой смеси, – массовое развитие толерантных к недостатку кислорода организмов: *Paramecium caudatum* и других свободноплавающих инфузорий, мелких бесцветных жгутиконосцев, нитчатых бактерий родов *Thiotrix*, *Sphaerotilus*, *Beggiatoa*, которые не исчезают при кратковременном увеличении аэрации.

Хлопки ила распадаются, надиловая вода мутнеет.

Признаки голодания АИ. При низких концентрациях питательных органических веществ формируется «голодающий» ил. При этом уменьшаются размеры простейших, особенно прикрепленных, клетки становятся прозрачными и мелкими, исчезают пищеварительные вакуоли, приостанавливается размножение. При дальнейшем голодании организмы образуют цисты. Последними в неактивное состояние переходят коловратки.

Хлопки ила распадаются, мельчают, становятся прозрачными, легкими. Возрастает число бактерий, не связанных с хлопками, и питающихся ими свободноплавающих инфузорий, мелких раковинных амеб, жгутиконосцев и т. п. В целом для «голодающего» ила характерно низкое видовое разнообразие биоценоза.

Признаки АИ, подвергшегося залповому сбросу токсичных веществ. Происходит резкое уменьшение разнообразия и численности видов. Снижается активность простейших, уменьшается размер тела. У инфузорий прекращается движение ресничек, у перитрих замыкается перистом.

Увеличивается количество одиночных бактерий, нитчатых серобактерий, мелких раковинных амеб. При сильном воздействии токсикантов происходит массовое инцистирование и гибель организмов, вплоть до их полного исчезновения. В этом случае очистка осуществляется только бактериями активного ила. Восстановительный период может продолжаться от 2 недель до нескольких месяцев.

Ил при воздействии токсичных сточных вод характеризуется диспергированием хлопков, вода над илом мутнеет.

Признаки перегрузки АИ. Наблюдается низкое видовое разнообразие биоценоза (5–13 видов), причем все виды с широкой экологической пластичностью. Много свободных нитчатых серобактерий рода *Beggiatoa*. Характеристика перегруженного биоценоза во многом соответствует активному илу с низким деструкционным потенциалом. Хлопки ила мелкие, раздробленные.

После проведения гидробиологического анализа необходимо полученные данные соотнести с результатами гидрохимических измерений. В целом полученный комплекс показателей позволяет охарактеризовать состояние процесса биологической очистки, выявить имеющиеся нарушения и дать необходимые рекомендации по их устранению.

3.6. Использование системы сапробности для характеристики качества очистки сточных вод

Степень загрязнения водных объектов органическими веществами определяет их ***сапробность*** (от греч. sapros – гнилой). Гидробионты, живущие в загрязненных органическими веществами водах и принимающие участие в процессах их разложения, называются ***сапробионтами***, или сапротрофами. К ним относятся бактерии, грибы, отдельные виды водорослей, водные животные.

Видовая структура сообществ гидробионтов в зависимости от их чувствительности к органическому загрязнению водоемов четко выражена на биоценотическом уровне. Исходя из этого немецкие исследователи Р. Кольквитц и М. Марссон предложили оценивать уровень загрязнения вод по наличию в них показательных организмов, или биоиндикаторов сапробности, и классифицировать воды по четырем зонам (ступеням): олигосапробной, α- и β-мезосапробной, полисапробной.

Система сапробности и списки индикаторных организмов в дальнейшем были дополнены рядом исследователей. Наиболее полная классификация зон сапробности выполнена В. Сладечеком, который включил в нее абиотические зоны, а внутри полисапробной выделил три – изосапробную (преобладание цилиат над флагеллятами), метасапробную (преобладание флагеллят над цилиатами) и гиперсапробную (отсутствие простейших при развитии бактерий и грибов). Характеристика отдельных зон приведена в табл. 3.1.

Происходящие в очистных сооружениях процессы по сути сходны с таковыми при самоочищении водоемов. Ступени очистки протекают последовательно от анаэробного гниения полисапробной

к чистоте олигосапробной зоны. Между ними α-мезосапробность выражает нарастание аэробных механизмов деструкции, а β-мезосапробность – завершение этого процесса, свидетельствуя о минерализации.

Таблица 3.1

Характеристика отдельных зон сапробности по В. Сладечеку

Зона сапробности		Индекс сапробности	Концентрация, мг/дм^3		
обозначение	название		$БПК_5$	O_2	H_2S
χ	ксеносапробная	0,00–0,50	1	8	0
o	олигосапробная	0,51–1,50	2,5	6	0
β	β-мезосапробная	1,51–2,50	5	4	0
α	α-мезосапробная	2,51–3,50	10	2	0
ρ	полисапробная	3,51–4,50	50	0,5	Следы
i	изосапробная	4,51–5,50	400	Следы	<1
m	метасапробная	5,51–6,50	700	0	<100
h	гиперсапробная	6,51–7,50	2 000	0	<10
u	ультрасапробная	7,51–8,50	120 000	0	0

Использование системы сапробности позволяет получить достаточно быструю и емкую оценку как типа водоема, так и качества функционирования очистного сооружения. Однако результаты гидробиологического анализа, представленные в форме списков индикаторов, всегда содержат виды, относимые к разным зонам сапробности, что усложняет однозначную оценку качества вод. Для преодоления этого затруднения предложены методы, позволяющие оценить среднюю сапробность биоценоза. В настоящее время используют системы, оценивающие качество вод по составу индикаторных организмов, по видовому разнообразию и по совокупности этих показателей.

3.6.1. Оценка качества очищенной воды по составу индикаторных организмов

В этом случае удобен **метод Р. Пантле и Г. Букка**, наименее трудоемкий и дающий возможность быстро получать достаточно точный ответ.

Для количественной оценки способности гидробионта обитать в воде с тем или иным содержанием органических веществ используют условное численное значение s_i – индикаторную значимость, или индивидуальный индекс сапробности i-го вида.

Для упрощения подсчетов делают допущение, что каждый вид характеризует одну из зон сапробности. Тогда для каждой произвольной гидробиологической пробы по всем видам, встретившимся в справочниках, можно вычислить средневзвешенный индекс сапробности S, который характеризует степень загрязнения в точке измерения:

$$S = \frac{\sum_{i=1}^{n} s_i \cdot h_i}{\sum_{i=1}^{n} h_i},$$

где n – число выбранных видов-индикаторов; s_i – индикаторная значимость вида; h_i – относительное количество особей вида.

Относительное количество особей в каждом объеме пробы, согласно Р. Пантле и Г. Букку, оценивают следующим образом: 1 – единичная встречаемость, 3 – частая встречаемость, 5 – массовое развитие. В. Сладечек прибегает к более дробной детализации: 1 – очень редко, 2 – редко, 3 – нередко, 5 – часто, 7 – очень часто, 9 – массовое развитие. Однако наиболее точный результат получают при использовании в расчетах фактического количества особей.

Для статистической достоверности результатов необходимо, чтобы в пробе содержалось не менее двенадцати индикаторных организмов с общим числом особей не менее тридцати.

Полученное значение индекса сапробности соответствует определенным зонам сапробности (табл. 3.1) и тесно коррелирует с величиной биохимического потребления кислорода (БПК).

В тех случаях, когда желательно не только определить степень сапробности данного биоценоза, но и выявить наиболее вероятные отклонения, пользуются **методом средневзвешенных сапробных валентностей М. Зелинки и П. Марвана**. Для уточнения результатов биологического анализа в этом случае введены понятия сапробной валентности и индикаторного значения вида.

Сапробная валентность отражает распределение вида по зонам сапробности. Каждому виду приписывается 10 баллов. В таблице (см. с. 257–263 «Фауна аэротенков: атлас» (А. А. Айсаев [и др.], 1984)) баллы распределяются соответственно тому, насколько вид характерен для той или иной зоны сапробности.

Индикаторное значение (индикаторный вес) вида J показывает, насколько вид ценен как индикатор сапробности. Оно

приводится в тех же таблицах в баллах от 1 до 5. Виды, характерные только для одной зоны (все 10 баллов сапробной валентности распределены в одной зоне сапробности), получают 5 баллов и имеют большее значение для оценки качества воды. Низшие баллы получают виды, считающиеся плохими индикаторами, валентности которых равномерно распределены по нескольким зонам сапробности.

Для определения степени сапробности всего биоценоза рассчитывают средневзвешенные сапробные валентности A_k отдельно для каждой из зон сапробности по формуле

$$A_k = \frac{\sum_{i=1}^{n} a_{ik} \cdot h_i \cdot J_i}{\sum_{i=1}^{n} h_i \cdot J_i},$$

где n – количество видов с известной сапробной валентностью; a_{ik} – сапробная валентность вида для k-й зоны сапробности; h_i – величина, характеризующая количество особей вида (может быть выражена в абсолютных числах, условных баллах или в процентных отношениях); J_i – индикаторное значение вида.

Сумма полученных средневзвешенных сапробных валентностей равна 10, а их соотношение характеризует картину сапробных условий в биоценозе. Биоценозу присваивают степень сапробности, соответствующую зоне с максимальной средневзвешенной сапробной валентностью, остальные показатели определяют возможность отклонений. Например, при расчете получены следующие значения: для ксеносапробной зоны – 0,5; для олигосапробной зоны – 5,2; для β-мезосапробной зоны – 2,8; для α-мезосапробной зоны – 1,5. Следовательно, биоценоз соответствует олигосапробной зоне, но при ухудшении условий обитания возможны отклонения в направлении β-мезосапробной зоны.

Системы оценки качества очищенной воды по индикаторным организмам имеют следующие недостатки:

1) не учитывается способность вида к адаптации в изменившихся условиях, поэтому некоторые организмы в работах различных авторов попадают в разные категории сапробности;

2) недостаточно исследовано действие на организмы отдельных факторов (низкое содержание O_2, действие CO_2, H_2S, NH_3 и

других производных распада органического вещества), внутривидовой и межвидовой конкуренции и т. д.;

3) системы учитывают только загрязнение органическим веществом, подвергающимся бактериальной деструкции. Для учета влияния токсичных органических и неорганических соединений промышленных вод делают попытки разработать шкалы токсобности и создать единую шкалу сапротоксобности;

4) списки показательных организмов составлены для Центральной Европы и не всегда применимы для других регионов, где отдельные виды могут приобретать совершенно иное индикаторное значение;

5) из-за отсутствия точной количественной методики невозможна статистическая обработка полученных результатов, осложнено их сопоставление с данными химического и бактериологического анализа.

Кроме того, оценка качества очищенной воды по индикаторным организмам на очистных сооружениях часто затруднена из-за отсутствия современных определителей для многих групп гидробионтов, несовершенства оборудования для взятия проб и их исследования, недостатка квалифицированных специалистов и т. п.

Тем не менее принцип оценки качества воды и происходящих в ней изменений по составу организмов-индикаторов прошел длительную проверку практикой и сохраняет свое значение в настоящее время, особенно при контроле работы аэробных очистных установок.

3.6.2. Оценка состояния биоценоза по видовой структуре

Индекс Шеннона. Для характеристики биоценозов очистных сооружений наиболее часто употребляется индекс видового разнообразия Шеннона H, который рассчитывают по формуле

$$H = -\sum_{i=1}^{n} p_i \cdot \log_2 p_i = \frac{-\sum_{i=1}^{n} p_i \cdot \lg p_i}{\lg 2},$$

где n – число видов в пробе; $p_i = x_i / x$ – доля i-го вида в сообществе; x_i – число особей, относящихся к i-му виду; x – общая численность особей в пробе.

Индекс Шеннона обладает следующими свойствами:

– если в пробе присутствует только один вид, индекс принимает минимально возможное значение ($H = 0$);

– при заданном количестве видов n и равномерном распределении особей по видам индекс максимален ($H = H_{max} = \log_2 n$);

– при заданном количестве видов n и неравномерном распределении особей по видам индекс лежит в диапазоне $0 < H < \log_2 n$.

При оценке работы очистных сооружений рост индекса Шеннона говорит об увеличении численности видов и равномерном распределении особей по видам, что свидетельствует об улучшении условий и повышении качества очистки сточных вод.

Однако индекс Шеннона надежно фиксирует только катастрофические изменения в биоценозе (максимальное количественное доминирование одного-двух видов), и его применение для изучения незначительных колебаний в экосистеме ила затруднительно.

Для того чтобы сделать выводы о специфике неблагоприятного воздействия на активный ил, желательно рассматривать порознь видовое богатство биоценоза и относительное обилие видов. Поэтому все большее распространение приобретает оценка состояния активного ила при помощи модифицированного индекса *Cuba*.

Модифицированный индекс *Cuba* D_m рассчитывают по формуле

$$D_m = n + Y_m,$$

где n – количество видов; Y_m – величина, связанная с распределением организмов по видам.

Для вычисления Y_m необходимо сначала определить величину Y:

$$Y = 1 - \frac{1}{2 \cdot x} \sum_{i=1}^{n} \left| \frac{x}{n} - x_i \right|,$$

где $x = \sum_{i=1}^{n} x_i$ – общее количество всех видов, присутствующих в биоценозе; x_i – количество организмов i-го вида.

Величину Y_m рассчитывают по формуле

$$Y_m = \frac{1}{1 - \frac{1}{n}} \cdot \left(Y - \frac{1}{n} \right).$$

Диапазон возможного изменения индекса $Cuba - n < D_m < n - 1$.

Целая часть индекса $[D_m]$ совпадает с количеством видов в биоценозе:

$$[D_m] = n.$$

Дробная часть $\{D_m\}$ показывает равномерность распределения организмов по видам. Для модифицированного индекса *Cuba* $\{D_m\}$ не зависит от количества видов и заключена в диапазоне $0 < \{D_m\} < 1$.

Результаты многолетних наблюдений за работой различных городских сооружений биологической очистки позволили сделать следующие выводы:

1) если $\{D_m\}$ находится в диапазоне $0 < \{D_m\} < 0{,}2$, то можно судить о минимальной выравненности и максимальном доминировании одного или двух видов в биоценозе, что характеризует сильное разрушение активного ила;

2) в диапазоне $0{,}2 < \{D_m\} < 0{,}4$ происходит последовательное выравнивание обилия видов, и основная численность особей распределяется по достаточно большой доле видов (порядка половины всех видов);

3) диапазон $0{,}4 < \{D_m\} < 1$ соответствует практически равномерному распределению количества особей по видам (максимальной их выравненности) и характеризует благополучие условий функционирования биоценоза.

В настоящее время еще не разработана общепринятая система биологического контроля, позволяющая надежно оценивать эффективность работы станций биологической очистки. Это связано с особыми условиями существования искусственных биоценозов, формирующихся в очистных сооружениях. Однако, несмотря на это, представляется перспективным использование биологических индексов для характеристики качества очистки сточных вод.

3.7. Лабораторная работа. Гидробиологический анализ активного ила

Вопросы для самоподготовки. 1. Трофические взаимоотношения в биоценозе активного ила. 2. Отклик биоценоза активного ила на внешнее воздействие. 3. Уровень развития биоценоза и его деструкционный потенциал. 4. Структура и свойства хлопков активного ила, формы нарушения процесса хлопьеобразования и их причины. 5. Признаки ухудшения экологических условий функционирования активного ила. 6. Оценка качества очищенной воды по составу индикаторных организмов: методы Пантле и Букка,

Зелинки и Марвана. 7. Оценка состояния биоценоза по видовой структуре: индекс Шеннона, модифицированный индекс *Cuba*.

Цель работы – оценка состояния и структурных особенностей биоценоза активного ила; определение типа биоценоза.

Порядок выполнения работы. Визуально исследовать ил. Определить иловый индекс. Оценить состояние хлопка активного ила. Установить видовой состав биоценоза активного ила. Определить численность организмов различных видов. Оценить физиологическое состояние организмов активного ила. Определить размеры организмов. Классифицировать организмы активного ила по индикаторным группам. Определить тип биоценоза и его характерные особенности.

3.7.1. Визуальное исследование ила

3.7.1.1. Определение динамики осаждения и поведения ила при отстаивании. Иловую смесь с температурой лабораторного помещения тщательно перемешивают и помещают в стеклянный цилиндр вместимостью 1 $дм^3$, установленный на горизонтальную поверхность. Отмечают объем, занимаемый оседающей массой активного ила, с интервалом 3 мин (по секундомеру). Через 30 мин отстаивания записывают окончательный объем, занимаемый осевшим илом, округляя до целых. Полученное значение используют для определения дозы ила по объему (см. п. 3.7.2.2).

По полученным данным строят график динамики осаждения. Делают вывод о скорости седиментации хлопка (быстро, медленно), отмечают минимальное время, за которое осаждается основная масса хлопков.

Фиксируют особенности процесса уплотнения ила: характер границы между осевшим илом и надиловой водой (четкая, размытая), равномерность осаждения (общей массой, с разрывом иловой массы), способность хлопков к флокуляции (компактные, диспергированные), отмечают наличие вспухания ила.

3.7.1.2. Определение цвета иловой суспензии. Фиксируют цвет иловой суспензии (бурый, рыжеватый, черный, белесый, зеленоватый и т. д.). Нормальный цвет ила – буро-коричневый. Темный, землистый ил с черным оттенком может быть следствием низкого уровня аэрации, плохого перемешивания иловой смеси, недостаточного удаления избыточного ила, нарушения циркуляции, что ведет к залеживанию и загниванию ила. Зеленоватый от-

тенок ила может быть обусловлен развитием цианобактерий при поступлении сточных вод, содержащих токсичные вещества. Белесый цвет характерен для «голодающего» ила.

3.7.1.3. Определение характера воды над осевшим илом.

Материалы и оборудование: цилиндр Снеллена (с прозрачным дном) диаметром 50–70 мм, вместимостью 1 $дм^3$, градуированный от самого дна, длина шкалы 400 мм, цена деления шкалы 10 мм; склянки вместимостью 2 и 5 $дм^3$; сифон, изготовленный из стеклянных трубок, соединенных резиновой трубкой; шрифт Снеллена № 1; штатив.

Ход анализа. Принцип метода заключается в визуальном определении светопропускания через столб надиловой воды. Мерой прозрачности служит высота столба воды, выраженная в сантиметрах, при которой можно читать шрифт определенного размера и типа.

Прозрачность определяется в пробе, отобранной в конце зоны аэрации или в сборном канале аэротенков.

Отобранную пробу иловой смеси с температурой лабораторного помещения тщательно перемешивают, помещают в склянку вместимостью 1,0–1,5 $дм^3$ и отстаивают в течение 2 ч. Для обеспечения равномерного осаждения ила каждые 30 мин сосуд поворачивают вокруг вертикальной оси. По окончании отстаивания среднюю часть надиловой воды при помощи сифона отбирают в цилиндр Снеллена. При этом следят, чтобы сифон не касался стенок склянки или осадка и не захватывал плавающие на поверхности частицы. Первую порцию отбираемой воды, равную объему сифона, отбрасывают.

Наполненный до краев цилиндр Снеллена закрепляют в штативе над стандартным шрифтом Снеллена № 1 на расстоянии 2 см. Чтение шрифта проводят в хорошо освещенной комнате, избегая попадания прямых солнечных лучей. Высоту столба жидкости постепенно уменьшают, отбавляя воду из цилиндра, до того момента, когда шрифт можно будет прочесть. Полученное значение прозрачности надиловой воды фиксируют.

Значение погрешности при диапазоне измерений прозрачности от 1 до 30 см составляет ±10%.

Надиловая вода должна быть прозрачной, не иметь окраски и опалесценции. Показатель прозрачности коррелирует с уровнем БПК в отстоянной пробе и характеризует эффективность удаления коллоидных веществ в аэротенках. Прозрачность городских сточных

вод на входе в очистные сооружения находится в пределах от 1 до 5 см. Для очищенных вод при неполной биологической очистке этот показатель должен составлять не менее 12 см, при полной очистке – 30 см и более. Диспергирование хлопков ила и появление большого числа свободноживущих бактерий, вызванные изменениями в составе сточных вод и режиме очистки, ведут к уменьшению прозрачности.

3.7.1.4. Определение запаха иловой суспензии. Определяют характер запаха иловой суспензии (табл. 3.2). Нормальным запахом ила считают болотный, без преобладания других запахов.

Таблица 3.2

Определение характера запаха

Характер запаха	Пример описания рода запаха
Аптечный	Лекарственных средств
Ароматический	Огуречный, цветочный
Болотный	Илистый, тинистый
Гнилостный	Фекальный, сточный
Древесный	Запах мокроты щепы, древесины
Землистый	Прелый, свежевспаханной земли
Нефтепродуктов	Бензина, керосина
Рыбный	Рыбьего жира, рыбы
Травянистый	Сена, скошенной травы
Химических веществ	Сероводорода, хлорфенола и др.
Неопределенный	Не подходящий под предыдущие определения

3.7.1.5. Определение других показателей иловой суспензии. При необходимости в описание включают также и другие показатели: наличие следов нефти, пены от синтетических моющих средств и др.

3.7.2. Определение илового индекса

Для характеристики седиментационных свойств АИ используют показатель илового индекса. Для вычисления илового индекса необходимо определить дозу активного ила по массе и по объему.

3.7.2.1. Определение дозы активного ила по массе. 100 $см^3$ тщательно перемешанной иловой смеси с температурой лабораторного помещения фильтруют через предварительно высушенный и взвешенный бумажный фильтр с помощью водоструйного насоса через воронку Бюхнера. Цилиндр тщательно споласкивают

небольшим количеством дистиллированной воды, полученную суспензию присоединяют к иловой смеси. Фильтр с отфильтрованной массой высушивают до достижения постоянной массы.

Дозу ила по массе d, г/дм^3, рассчитывают по формуле

$$d = \frac{(a-b)\cdot 1000}{V},$$

где a, b – вес фильтра с осадком и без осадка соответственно, г; V – объем отфильтрованной пробы, см^3.

Погрешность измерения составляет ±25%.

3.7.2.2. Определение дозы активного ила по объему. Доза ила по объему V, см^3/дм^3, характеризует седиментационные свойства ила. Иловую смесь с температурой лабораторного помещения тщательно перемешивают и помещают в стеклянный цилиндр вместимостью 1 дм^3, установленный на горизонтальную поверхность. Через 30 мин отстаивания записывают значение дозы ила по объему в кубических сантиметрах (см^3), округляя до целых. Погрешность измерения составляет ±25%.

При температуре выше 25°С может произойти всплывание осевшего активного ила вследствие денитрификации, поэтому анализ проводят в прохладном помещении, вдали от источников тепла, а в жаркое время года пробу перед анализом желательно охладить до 18–20°С в холодильнике.

3.7.2.3. Расчет илового индекса. Иловой индекс – объем, занимаемый 1 г сухого ила через 30 мин отстаивания в цилиндре вместимостью 1 дм^3. Иловой индекс I, см^3/г, находят как отношение дозы ила по объему V к дозе ила по массе d:

$$I = \frac{V}{d}.$$

Пониженные значения илового индекса (менее 80 см^3/г) характерны для активного ила с высокой зольностью, вызванной высокой минерализацией клеточного вещества или присутствием тяжелых взвесей. Ил с такими показателями может закупоривать коммуникационные сети. Возрастание илового индекса – показатель ухудшения седиментационной способности ила. Результатом является нарушение разделения иловой смеси во вторичных отстойниках и избыточный вынос взвешенных веществ с отстоянной водой. Стабильность значений илового индекса указывает на

удовлетворительные условия эксплуатации очистных сооружений. Для различных сооружений биологической очистки характерны свои определенные значения этого показателя. Оптимальными считают значения илового индекса в пределах 80–120 $см^3/г$, при таких показателях ил хорошо оседает. При значениях илового индекса 120–150 $см^3/г$ ил оседает удовлетворительно, больше 150 $см^3/г$ – плохо, что может свидетельствовать о развитии процесса вспухания активного ила.

Значение погрешности результатов измерений в диапазонах значений илового индекса 10–100, 100–300, 300–500, 500–980 $см^3/г$ не превышает 25, 12, 10 и 6% соответственно.

3.7.3. Определение состояния хлопка активного ила

Материалы и оборудование: микроскоп «Биологический»; предметные и покровные стекла; автоматические дозаторы достоинством 0,02–0,20 $см^3$; объект-микрометр; окуляр-микрометр; фотоаппарат.

Ход анализа. Состояние хлопка исследуют при микроскопировании взболтанной пробы. Каплю свежего ила наносят на предметное стекло, накрывают покровным стеклом и просматривают под микроскопом при увеличении ×40, ×100.

Визуально фиксируют размер хлопка (крупный, мелкий). При необходимости определяют точные размеры хлопков с применением объект-микрометра, окуляр-микрометра, можно воспользоваться также методом фотографирования (см. п. 3.7.7).

Структуру хлопка (плотный, рыхлый, прозрачный), его однородность, засоренность минеральными и посторонними органическими включениями определяют при увеличении микроскопа ×100, ×400.

Наличие большого количества детритных включений может быть следствием нарушения работы первичных отстойников (избыточный вынос взвешенных веществ), поступления в «голову» очистных сооружений избыточного активного ила, сточных вод низкого качества из минерализатора, иловой воды из илоуплотнителей, фугата из цеха обработки осадков, дренажных вод. Этот показатель может указывать также на присутствие в сточных водах специфических промышленных загрязняющих веществ, плохо удаляемых при механическом отстаивании. Однако, если сооружения не перегружены и качество очистки высокое, а иловой индекс характеризует хорошее отделение очищенной жидкости от

массы ила, то присутствие некоторых количеств детритных включений не играет отрицательной роли, а в некоторых случаях, наоборот, утяжеляет хлопок ила, улучшая его седиментацию.

3.7.4. Определение видового состава биоценоза активного ила

Реактивы, материалы и оборудование: микроскопы «Биологический», люминесцентный, фазовоконтрастный; чашки Петри; предметные и покровные стекла; автоматические дозаторы достоинством 0,02–0,20 $см^3$; объект-микрометр; окуляр-микрометр; фиксатор Утермеле; глицерин; 96%-ный этиловый спирт; формалин, 4–10%-ный водный раствор; уксусная кислота, 0,1%-ный водный раствор; сульфат никеля, 1%-ный водный раствор; нейтральный красный индикатор, 0,01%-ный раствор в 60%-ном этиловом спирте; раствор Люголя на глицерине; жидкость Люголя; метиленовый голубой, 0,5%-ный водный раствор; акридиновый оранжевый гидрохлорид; йод, 0,3%-ный и 1%-ный спиртовые растворы; метиловый зеленый, 0,05%-ный водный раствор; метил-грин-уксусная кислота.

3.7.4.1. Приготовление реактивов.

а) фиксатор Утермеле. В 20 $см^3$ дистиллированной воды с 5 г дважды сублимированного йода растворяют 10 г йодида калия, добавляют 50 $см^3$ дистиллированной воды и 5 г уксуснокислого натрия. Полученный раствор хранят не более месяца в склянке из темного стекла с притертой пробкой;

б) раствор Люголя на глицерине. Растирают в ступке 1 г кристаллического йода и 2 г йодистого калия с добавлением 3 $см^3$ дистиллированной воды и небольших порций глицерина. Постепенно добавляют глицерин, доводя объем до 100 $см^3$;

в) жидкость Люголя. Растирают в ступке 1 г кристаллического йода и 1 г йодистого калия с небольшим количеством дистиллированной воды. Прибавляя воду, доводят объем до 300 $см^3$;

г) акридиновый оранжевый гидрохлорид. Растворяют 3 мг акридинового оранжевого в 10 $см^3$ дистиллированной воды. Раствор готовят непосредственно перед окрашиванием;

д) метил-грин-уксусная кислота. 0,5 г метиленового зеленого растворяют в 100 $см^3$ дистиллированной воды. Полученный раствор экстрагируют хлороформом в течение 2–3 сут. Окрашенный слой хлороформа многократно сливают до полного прекращения

окрашивания. В отстоянный водный раствор добавляют 1 $см^3$ ледяной уксусной кислоты.

Организмы активного ила определяют в живом виде с помощью световой, люминесцентной, фазовоконтрастной микроскопии.

Каплю свежего ила наносят на предметное стекло, накрывают покровным стеклом и просматривают под микроскопом при увеличении ×100. В случаях, когда диагностические признаки трудно различимы, используют большие увеличения (например, ×400) и иммерсионную систему (объективы ×90, ×100). Исследование более крупных организмов (червей, коловраток) можно выполнять, помещая пробу ила в чашку Петри.

При высокой концентрации ила производят его разбавление. Чтобы не нарушать жизнедеятельность организмов, разбавлять пробу следует жидкостью, полученной из того же места, что и проба.

Рекомендуется просматривать до 5–10 препаратов, определяя виды организмов и отмечая их физиологическое состояние.

В ряде случаев при установлении видового состава биоценоза очистных сооружений необходимы фиксация и окрашивание организмов, их измерение, зарисовка и фотографирование.

3.7.4.2. Консервация и хранение проб активного ила. Для консервации используют жидкость Утермеле (3 капли фиксатора на 100 $см^3$ пробы). Хранение пробы допускается только для уточнения определения каких-либо видов, но не для гидробиологического заключения о состоянии биоценоза активного ила.

3.7.4.3. Фиксация организмов активного ила. Если определению мешает повышенная активность организмов, их следует фиксировать.

Для замедления движения всех организмов, включая червей и коловраток, к капле иловой смеси на предметном стекле добавляют каплю глицерина, тщательно перемешивают препаровальной иглой, накрывают покровным стеклом и рассматривают под микроскопом. Оптимальное количество глицерина подбирают опытным путем после 2–3-кратного повторения процедуры.

Для фиксации гидробионтов 1–2 капли этанола или 4–10%-ного водного раствора формалина наносят рядом с покровным стеклом и дожидаются, когда реагент диффундирует в каплю иловой смеси, находящуюся под стеклом. Не следует допускать передозировки реагентов, так как организмы могут сильно деформироваться, что затрудняет исследование.

Для фиксации коловраток используют 1%-ный водный раствор сульфата никеля.

Жгутиконосцев фиксируют 0,1%-ным раствором уксусной кислоты. Применение раствора Люголя на глицерине, жидкости Люголя позволяет, кроме фиксации, обеспечить также контрастирование мелких жгутиконосцев.

Не следует подсушивать препараты для остановки движения организмов, так как при этом происходит значительное искажение их формы, что затрудняет определение и оценку физиологического состояния животных.

3.7.4.4. Окрашивание препаратов активного ила. Производят для уточнения родовой и видовой принадлежности организмов.

Окрашивание жгутиконосцев. Наибольшие трудности возникают при определении и счете мелких жгутиконосцев из-за их малых размеров и активного движения. Окрашивание красителями, приводящими к гибели жгутиконосцев, не позволяет рассмотреть их вовсе. Поэтому для исследования этих организмов следует использовать витальные красители:

– нейтральный красный (0,1%-ный водный раствор) – для растительных жгутиконосцев;

– метиленовый синий – для животных жгутиконосцев;

– акридиновый оранжевый (дает наилучшие результаты при окрашивании цитоплазмы всех видов жгутиконосцев). Краситель обладает флуоресцентными свойствами, поэтому при исследовании обработанных им препаратов используют люминесцентный микроскоп.

Жгутики флагеллят хорошо видны в жидкости Утермеле, 0,3%-ном водном или 1%-ном спиртовом растворе йода. Следя под микроскопом за тем, чтобы жгутиконосцы оставались в поле зрения, протягивают под покровным стеклом реактив при помощи полосок фильтровальной бумаги. При этом жгуты и клетки окрашиваются в коричневый цвет, крахмал – в синий, парамилон йодом не окрашивается.

Ядра жгутиконосцев хорошо выявляются при фиксации их 0,1%-ным раствором уксусной кислоты.

Окрашивание инфузорий. Живых инфузорий подкрашивают, используя витальные красители: нейтральный красный хорошо прокрашивает пищеварительные вакуоли, метиленовый зеленый – ядерный аппарат и отчасти цитоплазму.

Для окрашивания ядер используют акридиновый оранжевый. В 100 $см^3$ иловой смеси вносят 1 $см^3$ раствора красителя и тщательно перемешивают. Нуклеиновые кислоты ядер (ДНК) окрашиваются в зеленый цвет, нуклеиновые кислоты ядрышек и цитоплазмы (РНК) – в красный. Микроскопируют с использованием люминесцентного микроскопа. При избытке красителя макронуклеус не выделяется четко, а избыточное свечение препарата затрудняет счет всех таксономических групп организмов.

Для окрашивания ядер можно добавлять к исследуемой капле иловой смеси одну каплю 5%-ного раствора уксусной кислоты. Инфузории при этом погибают, и ядра становятся видимыми.

Методику окрашивания метил-грин-уксусной кислотой используют для окрашивания ядер с одновременной фиксацией инфузорий. Ядерный аппарат приобретает темно-зеленый цвет, цитоплазма становится светло-зеленой, видны наружные реснички.

Окрашивание водорослей. Хроматофоры водорослей окрашивают акридиновым оранжевым.

Функциональное состояние водорослей на разных этапах очистки также оценивают при помощи акридинового оранжевого. Живые клетки микроводорослей окрашиваются в ярко-красный цвет, водоросли с угнетенным процессом фотосинтеза дают оранжево-розовую люминесценцию.

Идентификацию организмов производят согласно следующим источникам информации: «Фауна аэротенков: атлас» (А. А. Айсаев [и др.], 1984), «Методическое руководство по контролю процесса биологической очистки сточных вод: учебно-методическое пособие» (Р. М. Маркевич [и др.], 2009), «Активный ил: база данных» (Е. А. Флюрик [и др.], 2009).

3.7.5. Определение численности организмов различных видов

Материалы и оборудование: микроскоп «Биологический»; предметные и покровные стекла; автоматические дозаторы достоинством 0,02–0,20 $см^3$.

3.7.5.1. Определение количества гидробионтов по балльной системе. Принцип определения заключается в оценке относительной численности организмов активного ила по условной балльной шкале.

Каплю тщательно перемешанной суспензии активного ила объемом около 0,1 $см^3$ помещают на предметное стекло и накрыва-

ют покровным стеклом (желательно размером 24×24 мм). Препарат микроскопируют при увеличении ×40 или ×100, детали рассматривают при больших увеличениях. Просматривают 40 полей зрения, перемещая препарат зигзагообразно, стараясь охватить весь материал. Из каждой пробы отбирают не менее двух капель суспензии.

Учитывают все встречающиеся организмы. Оценивают относительную численность гидробионтов по условной 5-балльной шкале (табл. 3.3) либо, если данные используют в дальнейшем для математической обработки, по шестиступенчатой 9-балльной шкале (табл. 3.4).

Таблица 3.3

Оценка численности гидробионтов по 5-балльной системе

Частота встречаемости	Условные баллы встречаемости
Единично	1
Мало	2
Порядочно	3
Много	4
Масса	5

Таблица 3.4

Оценка численности гидробионтов по 9-балльной системе

Частота встречаемости	Доля вида в общем количестве экземпляров, %	Условные баллы встречаемости
Очень редко	1	1
Редко	1–3	2
Нередко	4–10	3
Часто	10–20	5
Очень часто	20–40	7
Масса	40–100	9

Метод позволяет достаточно быстро, за 10–15 мин, просматривать каждую пробу, и его удобно применять при массовых анализах активного ила. Однако полученные результаты субъективны, отличаются невысокой точностью и могут быть надежными только при достаточной квалификации исполнителя.

3.7.5.2. Определение абсолютного количества организмов различных видов в единице объема.

Подсчет организмов активного ила методом «откалиброванной капли». Метод является одним из наиболее удобных в практической работе.

Микропипеткой отбирают 0,1 см^3 тщательно перемешанной иловой смеси, наносят каплю на предметное стекло и накрывают покровным стеклом размером 24×24 мм. Подсчитывают организмы в 10 полях зрения, перемещая препарат по диагонали, при увеличении микроскопа ×100, при необходимости – ×400. Просматривают не менее трех препаратов. Количество организмов N, экз./см^3, определяют по формуле

$$N = \frac{S \cdot d}{\pi \cdot r^2 \cdot V},$$

где S – площадь покровного стекла, мм^2; d – среднее количество организмов в одном поле зрения, экз.; $\pi \cdot r^2$ – площадь поля зрения, мм^2 (радиус r поля зрения определяют по линейке объект-микрометра); V – объем капли, см^3.

Наиболее точные результаты получают при подсчете организмов во всех полях зрения. В этом случае удобнее использовать меньший объем суспензии (например, 0,025 см^3).

При подсчете крупных организмов (черви, водные клещи, личинки насекомых, тихоходки) объем жидкости увеличивают до 5–10 см^3. Подсчет ведут в чашке Петри диаметром около 9 см с ровным дном, толщина слоя воды – 1,5 см. Учитывают все организмы в данном объеме, а затем делают пересчет на 1 см^3.

Подсчет организмов активного ила многоступенчатым методом «откалиброванной капли» О. Г. Никитиной. Подсчет организмов осуществляется в три этапа.

I этап. На предметное стекло микропипеткой наносят откалиброванную каплю тщательно перемешанной иловой смеси объемом 0,01 см^3. Препарат накрывают покровным стеклом размером 9×9 мм, полученным путем разрезания стандартного покровного стекла размером 18×18 мм на четыре равные части. Препарат укрепляют в препаратоводителе и просматривают все поля зрения при увеличении ×100, перемещая его зигзагообразно, начиная от левого верхнего угла покровного стекла слева направо до конца, затем на одно поле зрения вниз и справа налево. Необходимо внимательно следить за тем, чтобы ни одно поле зрения не было пропущено.

II этап. На предметное стекло микропипеткой наносят откалиброванную каплю тщательно перемешанной иловой смеси объемом 0,1 см^3. Препарат накрывают покровным стеклом размером 24×24 мм. Просматривают все поля зрения при увеличении ×100.

Подсчитывают только те организмы, которые не встречались на первом этапе.

III этап. Со дна сосуда пипеткой отбирают произвольное количество осевшего ила и помещают между двумя предметными стеклами. Учитывают организмы, встречающиеся единично. Просматривают все поля зрения при увеличении ×100.

Для оперативного контроля можно ограничиться двумя первыми этапами.

По полученным данным можно рассчитать специфическую плотность организмов определенного вида P, тыс. экз./г сухого вещества активного ила, по формуле

$$P = \frac{N}{d \cdot V},$$

где N – число организмов определенного вида, экз.; d – доза ила по массе, г/дм^3; V – объем капли, см^3.

3.7.6. Оценка физиологического состояния организмов активного ила

При анализе физиологического состояния гидробионтов учитывают следующие показатели.

1. *Преобладающие группы* и виды организмов биоценоза. Надежными индикаторами состояния активного ила могут быть только организмы, встречающиеся в нем в значительных количествах.

2. *Степень упитанности* (хорошая, удовлетворительная, слабая). Важнейшим критерием упитанности служит интенсивность фагоцитоза, оцениваемая по количеству пищеварительных вакуолей. Другим критерием является степень прозрачности цитоплазмы.

3. *Состояние сократительных (пульсирующих) вакуолей*, выполняющих функцию осморегуляции. Обращают внимание на степень наполнения вакуолей и скорость их пульсации. При неблагоприятных условиях ритм пульсации замедляется, и осморегуляция нарушается. Размеры вакуолей характеризуют уровень кислорода в среде. Однако при длительном рассмотрении пробы под покровным стеклом наступает кислородное голодание, вследствие чего пульсирующие вакуоли останавливают пульсацию, расширяются и деформируют тела организмов. Поэтому, наблюдая за живыми инфузориями, нужно достаточно часто заменять препарат свежей каплей иловой смеси.

4. *Форма тела*. Этот признак особенно изменчив у прикрепленных кругоресничных инфузорий. Отклонения от нормы могут быть вызваны различными факторами. При хорошей упитанности форма тела расширенная, почти округлая или бочонковидная, при слабой – происходит вытягивание организмов и расширение предротовой области. При недостатке кислорода зооиды раздуваются вплоть до их разрыва. Токсические вещества вызывают возникновение различных уродств (вмятины, складки, асимметрия и т. д.).

5. *Состояние ресничного диска* у прикрепленных кругоресничных инфузорий (открыт, закрыт). Обычно он открыт и закрывается лишь при отклонении условий от нормы (избыточном количестве растворенных органических соединений, наличии токсикантов).

6. *Интенсивность работы ресничного аппарата*, обеспечивающего питание и движение инфузорий (интенсивная, слабая, полная неподвижность). Движение ресничек зависит от многих факторов, в первую очередь от температуры и химического состава среды.

7. *Размеры организмов* (нормальные, укрупненные, мелкие). В основном этот показатель связан с условиями питания. Однако токсические вещества, попадающие на очистные сооружения с промышленными стоками, также вызывают измельчание организмов.

8. *Характер размножения*, особенно наглядно проявляющийся на инфузориях. В основном им свойственно бесполое размножение, происходящее путем деления организма на две части. Однако время от времени в жизненный цикл включается половой процесс (конъюгация). Длина периода бесполого размножения у инфузорий варьирует в зависимости от жизненных условий. При обильном и разнообразном питании конъюгация задерживается, голодание и действие некоторых солей ускоряют ее наступление. Таким образом, наличие большого количества особей, размножающихся половым путем, указывает на сдвиг экологических условий в неблагоприятную сторону.

Для прикрепленных форм инфузорий отмечают также темп и количество образующихся подвижных особей, служащих для расселения («бродяжек»).

9. *Наличие цист*. Инцистирование – важное биологическое приспособление большинства простейших, обеспечивающее их

сохранность в период наступления неблагоприятных для их существования естественных условий (постепенное снижение температуры, подсушивание, ухудшение питания). В процессе образования цист сбрасываются или втягиваются органеллы движения, животные округляются и образуют на своей поверхности плотную защитную оболочку. При возвращении благоприятных условий простейшие покидают цисты и вновь становятся активными.

10. *Наличие погибших животных*. Гибель может быть вызвана или очень быстрым и резким изменением жизненно важных факторов, при котором животные не успевают инцистироваться, или воздействием чуждых им реагентов (токсиканты и т. д.). Обычно картина массовой гибели гидробионтов наблюдается при мощных залповых сбросах отходов промышленных предприятий.

К анализу физиологического состояния организмов следует подходить творчески, не ограничиваясь указанными признаками. Так, например, могут появляться сезонные и покоящиеся формы организмов, может меняться способ их питания и т. д.

3.7.7. Определение размеров организмов

Материалы и оборудование: микроскоп «Биологический»; микроскоп, оснащенный фотоприставкой; предметные и покровные стекла; автоматические дозаторы достоинством 0,02–0,20 $см^3$; окуляр-микрометр; объект-микрометр; фотоаппарат.

Ход анализа. В ряде случаев для уточнения систематического положения или функциональных особенностей организмов активного ила необходимо определение их размеров. Измерение организмов производят с помощью окуляр-микрометра и объект-микрометра. Если организмы подвижны, используют один из методов фиксации.

Более удобным и быстрым является определение размеров организмов методом фотографирования. При этом в большинстве случаев не возникает необходимости фиксировать подвижные организмы. При отсутствии микроскопа, оснащенного фотоприставкой, можно фотографировать с помощью обычного фотоаппарата через окуляр микроскопа. Таким же образом делают фотографии шкалы объект-микрометра. При этом важно помнить, что фотографии как шкалы, так и измеряемого объекта следует делать при одинаковом увеличении микроскопа и фотоаппарата. Далее определяют размеры организмов, используя любую компьютерную программу, открывающую графические изображения.

3.7.8. Классификация организмов активного ила по индикаторным группам

Проводят распределение организмов, обнаруженных в исследованной пробе ила, на характерные группы биоиндикаторов (раковинные амебы, голые амебы, крупные жгутиконосцы, мелкие жгутиконосцы, брюхоресничные инфузории, кругоресничные инфузории, свободноплавающие инфузории, сосущие инфузории, коловратки, первичнополостные черви (нематоды), брюхоресничные черви, вторичнополостные черви (олигохеты), тихоходки, водные клещи и т. д.). Основными критериями распределения служат пищевые потребности организмов, а также их способность существовать в определенном диапазоне значений экологических факторов (температуры, pH, концентрации растворенного кислорода, токсичных соединений и др.). По результатам анализа составляют таблицу (табл. 3.5). Уделяют внимание более многочисленным видам, отмечают массовое развитие, подавление либо исчезновение того или иного вида-индикатора.

Таблица 3.5

Результаты гидробиологического анализа

Индикаторная группа, название организма	Количество организмов, экз./см^3 (экз./г)	
	Название точки отбора проб № 1	Название точки отбора проб № 2

3.7.9. Определение типа биоценоза и его характерных особенностей

3.7.9.1. Оценка состояния биоценоза по видовой структуре. Рассчитывают индексы видового разнообразия – Шеннона, *Cuba*. Для удобства выполнения вычислений пользуются табл. 3.6.

Таблица 3.6

Таблица для расчета индекса Шеннона и модифицированного индекса *Cuba*

Название i-го вида	Число особей i-го вида	Доля i-го вида в сообществе	Данные промежуточных вычислений		
	x_i	$p_i = x_i / x$	$1 / n - x_i / x$	$\lg p_i$	$p_i \cdot \lg p_i$
Сумма					

По полученным значениям оценивают видовое богатство биоценоза и равномерность распределения особей по видам. Делают выводы об эффективности функционирования биоценоза.

3.7.9.2. Оценка качества очищенной воды по индикаторным организмам. Определяют индекс сапробности по методу Пантле и Букка, делают вывод, какой зоне сапробности соответствует изучаемый биоценоз.

Рассчитывают средневзвешенные сапробные валентности методом Зелинки и Марвана. Данные, соответствующие каждому виду (см. с. 257–263 «Фауна аэротенков: атлас» (А. А. Айсаев [и др.], 1984)), вносят в табл. 3.7 в ячейки, выделенные диагональной штриховкой. Результаты вычислений вносят в ячейки, отмеченные сплошной заливкой.

Биоценозу присваивают степень сапробности, соответствующую зоне с максимальной средневзвешенной сапробной валентностью, выявляют наиболее вероятные отклонения.

Таблица 3.7

Таблица для расчета индекса сапробности по методу Пантле и Букка и средневзвешенных сапробных валентностей по методу Зелинки и Марвана

Название индикаторных видов	Сапробные валентности по зонам a_{ik}							Индикаторное значение вида J_i	Степень сапробности s_i	Количество особей h_i
	χ	o	β	α	ρ	i	m			
$\sum_{i=1}^{n} a_{ik} \cdot h_i \cdot J_i$										
$\sum_{i=1}^{n} h_i \cdot J_i$										
$\sum_{i=1}^{n} s_i \cdot h_i$										
Средневзвешенные сапробные валентности A_k										

По результатам выполненных исследований и расчетов делают гидробиологическое заключение о состоянии активного ила, отмечают его особенности. Дают итоговую оценку биоценоза, относят его к одному из определенных типов, характеризуют установленный тип. Делают вывод об эффективности функционирования очистных сооружений.

4 БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ ПЕРЕРАБОТКА ПРОМЫШЛЕННЫХ ОТХОДОВ

4.1. Направления переработки молочной сыворотки

4.1.1. Состав молочной сыворотки

Молочная сыворотка – ценное пищевое сырье, включающее все компоненты молока – одного из самых ценных пищевых продуктов (табл. 4.1) и представляющее собой светло-желтую слегка тягучую жидкость с солоновато-кислым вкусом. Полностью все составные части молока используются лишь при получении цельномолочных продуктов (пастеризованного и стерилизованного молока, кисломолочных напитков).

Таблица 4.1

Содержание основных питательных веществ в молоке и молочной сыворотке

Компонент	Содержание, %	
	в молоке	в молочной сыворотке
Сухие вещества	11,0–13,0	4,5–7,2
Белки	3,0–4,0	0,5–1,1
Жиры	2,8–5,0	0,3–0,5
Сахара	4,5–5,0	3,9–4,9
Минеральные вещества	0,7–0,8	0,3–0,8

При производстве творога и сыров в готовый продукт переходит только половина сухих веществ, содержащихся в молоке, другая половина остается в сыворотке. Технология производства сливочного масла предусматривает использование лишь жировой части, остальные компоненты остаются в обезжиренном молоке и пахте.

Состав углеводов молочной сыворотки аналогичен составу углеводов молока: моносахариды (глюкоза, галактоза и др.), их производные, дисахарид лактоза и более сложные олигосахариды.

В сыворотку практически полностью переходят сывороточные белки молока (α-лактальбумин, β-лактоглобулин, иммуноглобулины), есть незначительное количество казеина в виде частиц размером менее 1 мм, образующихся при дроблении сырного зерна. В следовых количествах в сыворотке присутствуют ферменты.

Молочный жир в сыворотке находится в более диспергированном состоянии, чем в молоке, что положительно влияет на его усвояемость; содержание жира зависит от вида вырабатываемого молочного продукта, исходного сырья и режимов технологического процесса.

Минеральные вещества сыворотки находятся в растворимом, коллоидном и нерастворимом состоянии. Из катионов преобладают K^+, Na^+, Ca^{2+}, Mg^{2+}. Из органических кислот присутствуют молочная, лимонная и летучие кислоты – уксусная, муравьиная, пропионовая, бутановая.

В молочную сыворотку из молока в большей степени переходят водорастворимые витамины, чем жирорастворимые. Специфический желтовато-зеленый цвет сыворотки обусловлен наличием рибофлавина, при хранении сыворотки содержание его резко снижается.

Энергетическая ценность сыворотки составляет 36% энергетической ценности молока, однако биологическая ценность примерно такая же.

4.1.2. Использование молочной сыворотки в Республике Беларусь

Количество сыворотки составляет около 80% молока, перерабатываемого с получением творога, сыра и казеина. Только в Республике Беларусь ежегодно производится около 2 млн. т сыворотки, около 60% от этого объема приходится на подсырную сыворотку, 25% – творожную, 15% – казеиновую. Переработка сыворотки в настоящее время в Беларуси не превышает 25% от общего объема. Сыворотка в натуральном виде в количестве 45–50% направляется на корм сельскохозяйственных животных. Возврат сыворотки в хозяйства экономически невыгоден, поскольку приходится транспортировать жидкий продукт с низким содержанием сухих веществ.

Около 25% сыворотки, в основном казеиновой и творожной, сбрасывается в канализацию. Попадание молочной сыворотки в системы канализации, а в аварийных случаях и непосредственно в водоемы, наносит значительный урон окружающей среде – 1 т молочной сыворотки загрязняет водоемы так же, как 100 $м^3$ хозяйственно-бытовых стоков. Технологический уровень создаваемых в республике производств позволяет перерабатывать подсырную сыворотку и получать конечный продукт с целью дальнейшего использования в первую очередь для кормовых целей, а также отдельные партии – для производства пищевых продуктов. Вместе с тем установленное оборудование не позволяет перерабатывать творожную и казеиновую сыворотку, имеющие высокий уровень кислотности. Кислая сыворотка занимает в Беларуси до 40% от общего количества полученной в производстве сыворотки.

В Республике Беларусь реализуется государственная программа по полному использованию всех видов молочной сыворотки, нацеленная на получение продуктов для страны и на экспорт.

При большом объеме производств встают вопросы хранения, транспортировки, предварительной обработки сыворотки, а также высокой энергоемкости переработки, дефицита мощностей по ее промышленной переработке.

Можно выделить четыре основных направления применения молочной сыворотки: использование в натуральном виде, переработка и применение в виде концентратов, выделение и использование наиболее ценных компонентов, биотехнологическая переработка.

4.1.3. Использование сыворотки в натуральном виде

Применять натуральную молочную сыворотку можно как добавку к кормам сельскохозяйственных животных, а также в производстве кондитерских изделий и в хлебопечении. Одно из перспективных направлений – приготовление энергетических напитков на основе молочной сыворотки. В качестве наполнителей для напитков используются фруктовые соки, сахар, аскорбиновая и лимонная кислоты. По биологической и питательной ценности напитки на основе молочной сыворотки не уступают квасу. Для транспортировки и лучшего сохранения биологически активных компонентов сыворотки требуется ее охлаждение, при выпойке сельскохозяйственным животным нужен последующий ее нагрев.

4.1.4. Переработка и применение сыворотки в виде концентратов

Значительные расходы на транспортировку натуральной сыворотки и малые сроки ее хранения указывают на необходимость ее концентрирования упариванием и (или) сушкой. Для сушки натуральной и упаренной сыворотки используется сушка распылением, этот процесс становится рентабельным при переработке не менее 100 т жидкой сыворотки в сутки.

РУП «Институт мясо-молочной промышленности» (Республика Беларусь) созданы новые технологии для производства отечественных заменителей цельного молока (ЗЦМ), основными стадиями производства которых являются смешение компонентов, согласно рецептуре, с последующей сушкой смеси на распылительной сушилке. Разработаны кормовой продукт «Белакт» (смесь обезжиренного молока и сыворотки), продукт кормовой сухой для телят (смесь для кормления телят с 10-дневного возраста, состоящая из обезжиренного молока, пахты и (или) сыворотки, расплавленных немолочных жиров, стабилизированных антиокислителем, эмульгаторов, витаминов, микроэлементов), компонент сухой белковый для комбикормов (смесь сгущенной молочной сыворотки, муки соевой и (или) масла растительного и (или) молочного сахара) и др.

Сухая обезжиренная и сухая сладкая молочная сыворотка широко применяются в производстве хлебобулочных, кондитерских, колбасных и мясных изделий, плавленых сыров, напитков, комбикормов.

Прибыльность от сушки меньше, чем от глубокой переработки сыворотки, но оборудование по глубокой переработке дороже, и оно окупается при больших объемах производства.

4.1.5. Выделение и использование наиболее ценных компонентов сыворотки

Для более рационального применения сыворотки из нее извлекают молочный жир, комплекс белков или их отдельные фракции, лактозу и минеральные соли. Для разделения сыворотки на составляющие ее компоненты используются различные методы молекулярно-ситовой фильтрации: ультрафильтрация (концентрирование сыворотки, выделение фракции белка), гельфильтрация (фракционирование белков или продуктов гидролиза белков), ионный обмен и электродиализ (деминерализация сыворотки).

Белковые массы применяют для повышения биологической ценности других продуктов. Выделение сывороточных белков ультрафильтрацией или отвариванием (тепловая денатурация) и механическим воздействием позволяет получить микрогранулы белка. За рубежом эта технология отработана и реализована как часть технологии производства заменителей жира – сывороточный белок вырабатывается в виде мельчайших круглых шариков, по консистенции напоминающих кулинарный жир, который включается в различные замороженные десерты, мороженое, йогурты, пастообразные сыры. Изоляты сывороточного белка используются с целью усиления иммунитета ВИЧ-инфицированных больных, доказаны их противоопухолевые свойства и эффективность при борьбе с атрофическими дерматитами.

РУП «Институт мясо-молочной промышленности» разработана технология получения из сыворотки молочного сахара с последующим производством из него лактулозы. На одном из молокоперерабатывающих заводов Минска была запущена технологическая линия производства лактулозы с использованием электродиализной установки регулирования минерального состава конечного продукта и очистки его от продуктов, образующихся после процесса изомеризации, что позволяет получать лактулозу высокого пищевого и фармацевтического качества. Оригинальным направлением является физико-химическая обработка молочной сыворотки и ее компонентов с целью получения их производных: конверсия лактозы в лактулозу, гидролиз лактозы до моносахаридов и других продуктов.

Деминерализованная молочная сыворотка (сгущенная и сухая) лишена солоноватого вкуса и повышенной кислотности, что позволяет более широко применять ее в пищевой промышленности, при этом удельный вес затрат на технологический процесс деминерализации составляет 4% от себестоимости продукции. Например, сыворотка молочная, деминерализованная на 90%, широко используется при производстве детского питания и заменителей женского молока, потому что имеет сбалансированный состав по лактозе, сывороточным белкам и минералам.

Молочный жир применяется при выработке сыров, мороженого и масла.

4.1.6. Биотехнологическая переработка сыворотки

Молочная сыворотка содержит значительное количество углеводов (лактозы), минеральных солей и витаминов, поэтому является полноценным сырьем для биотехнологической переработки. Культивирование микроорганизмов корректирует соотношение белков и углеводов в сыворотке с 1 : 4,5 до 1 : (0,1–2,0). Основные направления биотехнологической переработки сыворотки:

– синтез белковых веществ дрожжами, использующими для роста и развития лактозу;

– гидролиз лактозы ферментами до более сладких моносахаридов (глюкозы и галактозы);

– микробный синтез витаминов, жира, ферментов и антибиотиков;

– переработка лактозы в молочную кислоту и этиловый спирт;

– расщепление молочных белков до свободных аминокислот.

В качестве продуцентов в биотехнологических процессах получения различных пищевых и кормовых продуктов из молочной сыворотки могут служить разнообразные представители аэробных и анаэробных микроорганизмов, обладающих одним общим для них свойством – способностью утилизировать лактозу. Микроорганизмы, используемые для биотехнологической переработки молочной сыворотки, приведены в табл. 4.2.

Таблица 4.2

Микроорганизмы, используемые для переработки молочной сыворотки

Продуценты	Продукты
Молочнокислые бактерии	Молочная кислота, лечебно-профилактические пищевые и кормовые продукты, напитки, бакконцентраты, антибиотик низин
Уксуснокислые бактерии	Уксусная кислота, столовый уксус
Пропионовокислые бактерии	Пропионовая кислота, уксусная кислота, витамин B_{12}
Клостридии	Спирты, рибофлавин, масляная кислота
Дрожжи	Белково-витаминные кормовые и пищевые препараты, ферменты, жир, рибофлавин, каротиноиды, этанол, лечебно-профилактические и столовые напитки
Микроскопические (плесневые) грибы	Белково-витаминные кормовые препараты, ферменты, жир, рибофлавин, каротиноиды, лимонная кислота, антибиотики

При оптимальных условиях культивирования некоторые штаммы дрожжей дают более 40 г биомассы из 1 дм^3 сыворотки. Культуральная жидкость, полученная в результате выращивания дрожжей на сыворотке, по составу приближается к обезжиренному молоку и значительно превосходит по содержанию белка и биологически активных веществ исходную сыворотку (табл. 4.3).

Таблица 4.3

Сравнение состава творожной сыворотки (исходной и обогащенной микробным белком) и обезжиренного молока

Показатель	Творожная молочная сыворотка		Обезжиренное молоко
	исходная	обогащенная микробным белком	
Сухие вещества, %	4,8–5,4	4,6–5,2	8,0–8,6
В том числе: – белок	0,7–0,8	2,4–3,2	2,7–3,5
– лактоза	3,8–4,2	0,1–0,2	4,5–4,8
– жир	0,1–0,2	0,3–0,6	0,05–0,10
– зола	0,7–0,8	0,8–0,9	0,7–0,8
Кальций, мг/дм^3	850–900	400–450	1000–1200
Тиамин, мг/дм^3	1,4–2,2	11,4–12,0	1,1–1,8
pH	4,5–4,7	5,8–6,0	6,4–6,6
Кислотность, °Т	65–70	22–24	20–22

Дрожжевой белок, синтезированный на молочной сыворотке, сходен по составу и наличию незаменимых аминокислот с белком молока. Обогащенная микробным белком сыворотка является исходным сырьем для получения кормовых продуктов типа «Промикс», «Провилакт» и Био-ЗЦМ.

Ферментативный катализ лактозы молочной сыворотки β-галактозидазой (лактазой) позволяет получить продукты, обогащенные более сладкими, в сравнении с лактозой, легко растворимыми и усваиваемыми монозами – глюкозой и галактозой. На этой основе разработана технология гидролизованной молочной сыворотки в натуральном, сгущенном и сухом виде.

Сквашивание молочной сыворотки культурами молочнокислых бактерий позволяет получать белково-углеводные концентраты сброженной сыворотки и специальные закваски для силосования кормов.

Разработан процесс производства из лактозы лактобионовой кислоты, используемой в качестве ингредиента растворов, приме-

няемых для хранения трансплантированных органов. Лактобионовая кислота используется также при производстве средств бытовой химии, защиты от коррозии.

В Канаде разработана технология производства бактериоцина пищевого назначения путем применения иммобилизованных клеток молочнокислых бактерий. Такие бактериоцины могут использоваться как пищевой биоконсервант в плавленых сырах и консервах. Из сыворотки выделяют также другие биоконсерванты – лактоферрин, лактопероксидазу.

Биотехнологической переработке сыворотки обычно предшествует ее подготовка, включающая обеспложивание сыворотки и отделение жира и белка. Для этого сыворотка подогревается до 45°С для снижения вязкости и направляется на отделение молочного жира в виде сливок 15–25%-ной жирности методом сепарирования. Обезжиренная сыворотка подогревается до 70–75°С горячей водой, а затем паром до 90–95°С для коагуляции белков, которые отделяются в сепараторе и собираются для дальнейшего применения. Современные технологии подготовки сыворотки могут включать и другие методы ее обработки (например, мембранное разделение).

Выделенные на первой стадии сепарирования сливки можно возвращать на основное производство и использовать для получения качественного масла путем смешивания с обычными сливками в соотношении 1 : 9. Имеется положительный опыт применения подсырных сливок для нормализации смеси при производстве натуральных сыров и сметаны.

Белковая суспензия, полученная после второй стадии сепарирования, смешивается с раствором мелассы и используется в качестве белково-углеводной добавки в основной рацион сельскохозяйственных животных. Опытом доказано, что внесение концентратов положительно влияет на прирост массы, настриг шерсти у молодняка овец, прирост массы цыплят-бройлеров и поросят-откормышей. Установлена также возможность и целесообразность применения сывороточных концентратов при гранулировании комбикормов.

Подготовленная сыворотка подается в ферментатор, туда же направляется чистая культура микроорганизмов (бактерий или дрожжей), полученная путем ступенчатого культивирования штамма продуцента в аппаратах увеличивающегося объема.

Переработка культуральной жидкости из ферментатора зависит от получаемого продукта. При обогащении сыворотки белком одноклеточных микроорганизмов культуральная жидкость упаривается, подвергается плазмолизу и высушивается на распылительной сушилке. В случае отсутствия целевого использования белкового концентрата сывороточных белков он может быть смешан с полученным сухим кормовым концентратом. При получении биологически активных (витаминов, ферментов, антибиотиков) и других органических веществ (спиртов, органических кислот) переработка культуральной жидкости будет основана на выделении целевого компонента.

4.2. Лабораторная работа. Переработка молочной сыворотки с получением белкового концентрата и этанола

Вопросы для самоподготовки. 1. Состав молочной сыворотки и биологическая ценность ее основных компонентов. 2. Использование молочной сыворотки в натуральном виде. 3. Переработка и применение сыворотки в виде концентратов. 4. Выделение и использование наиболее ценных компонентов сыворотки. 5. Основные направления биотехнологической переработки сыворотки. 6. Подготовка сыворотки к биохимической переработке. 7. Биохимизм спиртового брожения.

Цель работы – освоение методов подготовки молочной сыворотки к биохимической переработке; моделирование производственного процесса сбраживания сыворотки в этанол; овладение методами контроля состава бражки.

Порядок выполнения работы. Подготовить сыворотку к биохимической переработке. Установить содержание углеводов в сыворотке. Подготовить посевной материал. Провести сбраживание сыворотки в этанол. Проанализировать полученную бражку.

4.2.1. Подготовка молочной сыворотки к биохимической переработке

500 $см^3$ сыворотки подогревают до температуры 45°С и отделяют жир методом центрифугирования в течение 20 мин при 6000 $мин^{-1}$. Обезжиренную сыворотку подогревают до 95°С, вы-

держивают при этой температуре 15 мин с целью коагуляции белков и снова центрифугируют при тех же параметрах. В подготовленной таким образом сыворотке устанавливают исходное содержание углеводов (см. п. 4.2.2).

4.2.2. Установление содержания углеводов

Углеводы молочной сыворотки представлены в основном дисахаридом лактозой. Для гидролиза лактозы к 50 $см^3$ сыворотки добавляют 5 $см^3$ 2%-ного раствора серной кислоты. Гидролиз проводят при температуре 90–95°С на протяжении 20 мин, а затем устанавливают содержание редуцирующих сахаров эбулиостатическим методом (см. п. 5.3.6).

4.2.3. Подготовка посевного материала

Для сбраживания лактозы молочной сыворотки используют «молочные дрожжи»: *Kluyveromyces fragilis*, *Kl. lactis*, *Kl. marxianus*. Сначала проводят выращивание дрожжей в пробирках со скошенной поверхностью агаризованной среды (сусло-агара) в течение 48 ч при температуре 30°С. Далее в качалочную колбу помещают 50 $см^3$ сыворотки, из которой удален жир и белок (см. п. 4.2.1), обогащают минеральными солями в виде 20%-ных растворов в количестве, % от объема среды: сернокислый аммоний – 0,5, двухзамещенный фосфорнокислый аммоний – 0,2, двухзамещенный фосфорнокислый калий – 0,2, мочевина – 0,25, хлористый магний – 0,05, стерилизуют в автоклаве при давлении 0,05 МПа на протяжении 30 мин. Колбы засевают культурой из пробирок со скошенным агаром и инкубируют при 30°С в течение 48 ч.

4.2.4. Сбраживание углеводов сыворотки в этанол

50 $см^3$ сыворотки наливают в коническую колбу, вносят посевной материал (см. п. 4.2.3) в количестве 10%, помещают в анаэростат для сбраживания углеводов молочной сыворотки в спирт при температуре 30°С на 24 ч. Бражку центрифугируют на протяжении 15 мин при 6000 $мин^{-1}$, в фугате устанавливают содержание остаточных углеводов (см. п. 4.2.2) и этанола (см. п. 4.2.5).

4.2.5. Анализ бражки на содержание этанола

Для подготовки пробы к анализу ее центрифугируют при 15 000 $мин^{-1}$ в течение 15 мин, затем фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм.

Содержание этанола в бражке устанавливают на газожидкостном хроматографе Agilent 7820A с использованием кварцевой капиллярной сильнополярной колонки длиной 60 м, диаметром 535 мм и толщиной слоя сорбента 1 мкм (сорбент – слой поперечно-связанного молекулярно-сшитого полимера полиэтиленгликоля, модифицированного нитротерефталевой кислотой). Газ-носитель – азот с расходом 145 $см^3$/мин. Программа работы термостата: 60°С (выдержка 4 мин) → 220°С (со скоростью 10°С/мин) → продувка при 220°С (10 мин). Температура пламенно-ионизационного детектора – 280°С, температура испарителя – 220°С. Объем вводимой пробы – 0,1 мкл, деление потока – 15 : 1.

Подготовленную пробу переносят в хроматографический флакон, устанавливают в гнездо автоматического пробоотборника и выполняют анализ.

4.3. Сравнительная оценка направлений переработки послеспиртовой барды

4.3.1. Состав послеспиртовой барды

В нашей стране основным сырьем для производства высококачественного этанола является зерно злаков (пшеница, рожь, тритикале). Производство этанола из углеводсодержащего сырья сопровождается образованием крупнотоннажного отхода – послеспиртовой барды. При масштабах производства этанола в Республике Беларусь 9,2 млн. дал в год общий объем послеспиртовой барды составляет около 1,3 млн. $м^3$ при существующей тенденции к увеличению мощностей по производству этанола.

Зерновая послеспиртовая барда содержит 6–8% сухих веществ, в том числе 26–28% сырого протеина (мертвые клетки продуцентов этанола), 6,0–7,5% жира, 12,8–13,4% клетчатки, 7,6–7,8% минеральных веществ, а также органические кислоты, витамины, спирты. Около 50% сухих веществ находятся в барде в растворенном состоянии, а вторая половина – в виде взвешенных веществ (дробина). В барде присутствуют мертвые клетки дрожжей – продуцентов этанола (источник протеина), органические кислоты, аминокислоты, витамины, микро- и макроэлементы. Из-за высокого содержания органических веществ послеспиртовую барду не-

возможно направить на биологические очистные сооружения. Сброс барды в естественные водоемы недопустим, так как приводит к эвтрофикации водоемов и грозит серьезным экологическим ущербом. Необходимость обеспечения надлежащего экологического уровня спиртового производства требует обязательной утилизации послеспиртовой барды.

4.3.2. Использование послеспиртовой барды в Республике Беларусь

Наличие протеина и биологически активных веществ придает барде самостоятельную кормовую ценность, в связи с чем основным методом утилизации послеспиртовой барды в Республике Беларусь является реализация натуральной барды животноводческим фермам и частным хозяйствам в качестве кормовой добавки. Однако натуральная барда не подлежит длительному хранению (развиваются гнилостные процессы), имеет место сезонность спроса на барду, существенны затраты на доставку ее потребителю. Кроме того, перевариваемость сырого протеина барды низкая и составляет около 52%. Этот показатель может быть увеличен до 85–89% обогащением барды белком в результате аэробного культивирования на барде дрожжей рода *Candida*. При этом резко возрастает кормовая ценность барды из-за обогащения ее, кроме белка, витаминами группы В и другими биологически активными веществами, появляется возможность получения полноценной кормовой белково-витаминной добавки. Данный метод микробиологической переработки барды применяется на ряде спиртовых заводов Российской Федерации и освоен в опытно-промышленных масштабах на ОАО «Бобруйский завод биотехнологий». Промышленная реализация технологии на серийном отечественном энергозатратном оборудовании показала ее недостатки: большие затраты энергии на аэрацию барды в дрожжерастильных аппаратах и на последующее обезвоживание дрожжевой биомассы при невысоком выходе продукта. Практически реализация продукта позволяет только покрыть затраты на его производство.

4.3.3. Использование послеспиртовой барды в мировой практике

Технологии переработки барды, применяемые в мировой практике, можно условно разделить на три принципиально различающиеся технологические схемы:

1) получение сухой барды с использованием процессов центрифугирования, упаривания и сушки;

2) аэробная микробиологическая переработка жидкой фазы барды с получением белоксодержащего кормового продукта;

3) анаэробная переработка барды в метантенках с получением биогаза и кормового продукта, содержащего витамин B_{12}.

4.3.3.1. Получение сухой барды с использованием процессов центрифугирования, упаривания и сушки. В сухом веществе барды присутствует протеин (24–28%), основным источником которого являются мертвые клетки дрожжей – продуцентов этанола. Этот факт обусловил распространение в странах Евросоюза и США технологии сушки барды с получением белоксодержащей кормовой добавки. Взвешенные вещества барды отделяются центрифугированием, фугат частично используется в основном производстве, а большая часть его упаривается в выпарной установке до концентрации сухих веществ 30–35%, концентрат смешивается с кеком и высушивается в сушилке барабанного типа. Значительные энергетические затраты идут на обезвоживание барды, доля перевариваемого протеина в продукте невысокая. Конденсат выпарной установки имеет высокий уровень загрязненности (1500–3000 мг/дм^3 по ХПК) и требует отдельной очистки, что не заложено в технологии.

В Российской Федерации на ряде спиртовых заводов реализована укороченная схема переработки барды в сухой продукт (перерабатывается только твердая фаза барды – кек).

Применение мембранных установок для концентрирования фугата позволяет резко уменьшить затраты энергии, однако производительность установок невысокая из-за низкой пропускной способности мембран.

4.3.3.2. Аэробная микробиологическая переработка жидкой фазы барды с получением белоксодержащего кормового продукта. Принципиальное отличие аэробной микробиологической переработки барды от технологии сухой барды состоит в том, что фугат барды не подвергается упариванию, а используется в качестве питательной среды для аэробного культивирования дрожжей – продуцентов белка. В качестве продуцентов белка применяют дрожжи родов *Candida*, *Trichosporon*. Полученную дрожжевую суспензию концентрируют сепарированием, подвергают

плазмолизу и упаривают, дрожжевой концентрат присоединяют к кеку. Технология непригодна для спиртовых заводов небольшой мощности, так как требует больших капиталовложений и значительных эксплуатационных затрат. Низкое содержание ассимилируемого субстрата в барде не позволяет достичь высокой продуктивности процесса культивирования продуцентов белка. В среднем продуктивность культур по сухой биомассе колеблется в пределах 1,9–3,0 кг/($м^3$ · ч).

Предложена технология переработки барды в смеси с крахмалсодержащими продуктами – мукой (в количестве 3%) или ферментолизатом зернового сырья (10–20%), что позволяет увеличить выход кормового продукта и содержание белка в нем. В качестве продуцентов белка используется консорциум микроорганизмов, состоящий из дрожжей *Saccharomycopsis fibuligera* ВСБ-12 и бактерий *Rhodococcus erhytropolis* ВСБ 655. Для гидролиза полимерного субстрата барды необходима предварительная обработка ее ферментными препаратами при температуре 50–60°С в течение 1 ч. Получаемый продукт содержит более 55% сырого протеина, а продуктивность консорциума по сухой биомассе достигает 5,7–6,2 кг/($м^3$ · ч).

4.3.3.3. Анаэробная переработка барды в метантенках с получением биогаза и кормового продукта, содержащего витамин B_{12}. Себестоимость продуктов переработки барды по рассмотренным выше технологиям находится в жесткой зависимости от цен на энергоносители. В этом отношении явные преимущества имеют технологии анаэробной переработки барды, продуктом которых является биогаз, содержащий более 60% метана. Энергетический потенциал биогаза составляет 20–27 МДж/н. $м^3$. В мировой практике биогаз используется в качестве топлива для получения пара, горячей воды, горячего воздуха или топочных газов; для выработки электроэнергии (из 1 н. $м^3$ биогаза получают 2–3 кВт · ч электроэнергии); в качестве топлива для автомобильных двигателей; для подпитки сетей природного газа.

Выход биогаза из 1 т барды в среднем составляет 40–100 н. $м^3$, а содержание метана в биогазе равно 65–70%. Для каждого типа барды технологические регламенты необходимо разрабатывать на основании экспериментального определения оптимальных условий анаэробного разложения органических веществ.

Российскими исследователями предложена комплексная малоотходная технология утилизации послеспиртовой зерновой барды, включающая следующие стадии: сбор исходной барды и предварительное кислое сбраживание ее в течение 12–16 ч с одновременным отстаиванием плотной части барды; фильтрация плотной части барды на сетчатых барабанных фильтрах с пористостью сетки 1,5 мм с отделением дробины от жидкой фазы барды; охлаждение жидкой фазы барды до 40–60°С и подщелачивание ее до pH 6 для денатурации белков с выпадением их в осадок; отделение белка на фильтр-прессах и сушка белкового концентрата и дробины с получением кормового продукта на вакуумных низкотемпературных инфракрасных сушилках; ферментативная обработка фильтрата барды и его сбраживание в анаэробных биореакторах на протяжении 18–36 ч; осветление сброженного фильтрата в отстойниках с повторным использованием отстоявшегося ила в биореакторах; возврат 50% осветленных на отстойниках растворов с концентрацией остаточных органических веществ по ХПК 1500–2000 мг/дм^3 в основное технологическое производство спирта; доочистка второй части 50% осветленных на отстойниках растворов до уровня загрязнений по ХПК 30–50 мг/дм^3; использование 30% воды после доочистки для технических нужд завода (подпитка системы охлаждения оборудования, промывка технологического оборудования и т. п.); сброс в городскую канализацию 20% очищенной воды.

Украинская компания предлагает упрощенную технологию анаэробной переработки барды: жидкий сброженный остаток барды после получения биогаза применяется в качестве удобрения, которое содержит азот, фосфор, калий, без патогенных микроорганизмов и специфических запахов.

Анаэробное сбраживание жидкой части барды в термофильных условиях (50–55°С) может быть использовано для получения биогаза и кормового препарата витамина B_{12} (цианкоболамина). В Российской Федерации такая технология хорошо отработана в промышленных масштабах на ацетонобутиловой барде и в принципе применима для переработки послеспиртовой барды. Витамин B_{12} играет важную роль в обмене веществ у сельскохозяйственных животных и птиц, способствует их росту, повышает степень усвоения растительного белка. Добавка витамина особенно важна при несбалансированности кормов по аминокислотному составу.

При анаэробном сбраживании барда обогащается витамином B_{12} за счет продуцирования его метановыми бактериями. Биосинтез витамина интенсифицируется при обогащении барды солями кобальта, метанолом или этанолом, 5,6-диметилбензилимидазолом (5,6-ДМБ). В частности, при добавлении к барде метанола (1%) и 5,6-ДМБ (5 мг/дм^3) содержание витамина в сброженной барде возрастает в 4,5 раза.

Разработана российская технология, по которой барда подвергается микробиологической обработке с помощью специально селекционированного консорциума анаэробных микроорганизмов, которые накапливают биомассу и обогащают продукт веществами (органическими кислотами, ферментами), обладающими защитно-профилактическими свойствами (пробиотическим действием). Консорциум микроорганизмов состоит из двух штаммов бактерий: молочнокислых *Lactobacillus acidophilus* и пропионовокислых *Propionibacterium freudenruchii*, которые культивируют вместе. Эти микроорганизмы являются анаэробами, при их выращивании не требуется аэрация питательной среды, что делает процесс высокоэкономичным. Микроорганизмы непатогенны, нетоксичны, разрешены для использования в производстве пищевых продуктов и ветпрепаратов. Совместное выращивание бактерий проводят при температуре 37–50°С и pH 5,9–6,0 при периодическом перемешивании. Продолжительность ферментационного процесса составляет 24 ч (получают продукт, содержащий живые клетки бактерий в активной фазе роста) или 50 ч (получают продукт с повышенным содержанием белка).

Товарный продукт получают центрифугированием или фильтрованием сброженной массы и используют в сыром виде (влажность 50–60%) или подсушивают до влажности 12%. Предполагается возврат фугата в спиртовое производство. Массовая доля протеина в продукте составляет 35–46% от сухого вещества. Продукт может храниться до 3 месяцев. Разработанная технология реализована в промышленном масштабе на одном из спиртовых заводов Рязанской области.

Сотрудниками кафедры биотехнологии и биоэкологии БГТУ была разработана энергосберегающая схема переработки барды в биогаз и кормовой продукт, позволяющая получить из зерновой послеспиртовой барды пригодный для реализации сухой кормовой продукт и использовать энергию образующегося биогаза для обезвоживания и сушки продукта.

Предложенная технология комплексной переработки послеспиртовой барды включает следующие технологические стадии:

– преацидификация барды в присутствии гидролитических ферментов, расщепляющих полисахаридные компоненты, с одновременным культивированием факультативно-анаэробного термотолерантного штамма – продуцента белка;

– разделение фаз барды центрифугированием с получением кека и фугата;

– сушка кека в роторно-дисковой сушилке с получением кормового белоксодержащего продукта;

– анаэробное сбраживание фугата барды в UASB-реакторе с получением биогаза;

– доочистка осветленного сброженного фугата ультрафильтрацией;

– адсорбционная очистка биогаза от сероводорода.

Высокое содержание полисахаридов в сухом веществе барды и низкая скорость их расщепления анаэробными бактериями обусловливают целесообразность предварительной ферментативной обработки барды с целью гидролиза полисахаридных компонентов до мономеров (моносахариды, уроновые кислоты), которые легко ассимилируются микроорганизмами с накоплением белоксодержащей микробной биомассы. Максимальное количество редуцирующих веществ (РВ), которое может быть получено при полном гидролизе полисахаридов послеспиртовой барды, составляет 3%. При внесении ферментного препарата целлюлолитического действия в виде 1%-ного раствора в послеспиртовую барду в количестве 0,5–1,0 $см^3$ на 100 $см^3$ барды (pH 4,5) с последующей выдержкой в течение 24 ч при температурах 42 и 50°С концентрация редуцирующих веществ в барде возрастает с 0,25 до 1,5%, что составляет 50% от потенциального количества редуцирующих веществ, образующихся из полисахаридов послеспиртовой барды. Содержание клетчатки в сухом веществе барды снижается под воздействием фермента на 40%, дальнейший процесс расщепления клетчатки затормаживается ингибированием ферментов продуктами ферментолиза. Совмещение процессов ферментативной обработки и преацидификации барды позволяет нивелировать ингибирование ферментов за счет потребления редуцирующих веществ кислотогенными микроорганизмами и повысить степень расщепления клетчатки.

Ультразвуковая обработка послеспиртовой барды приводит к увеличению степени дисперсности частиц взвешенных веществ и повышению их биодоступности для ферментных систем микроорганизмов, однако переход взвешенных веществ в растворенное состояние не наблюдается. Например, при дозе введенной энергии 80 000 Дж/кг сухих веществ (СВ) послеспиртовой барды выход биогаза увеличивается в 3,25 раза и составляет 176,43 $м^3$/т СВ.

Послеспиртовая барда выдерживается в сборнике-отстойнике для разделения фаз влажной дробины и осветленной барды, а также проведения преацидификации (осуществления стадий гидролиза и кислотогенной стадии). Для интенсификации процесса гидролиза полимерных компонентов барды применяется обработка ее раствором ферментного препарата целлюлолитического действия либо ультразвуком. С целью дополнительного накопления белка одноклеточных на стадии преацидификации предложено использовать культивирование термотолерантного факультативно-анаэробного штамма дрожжей *Lachancea fermentati*. При культивировании на ферментированной послеспиртовой барде в условиях отсутствия аэрации при 42°С (ограниченное развитие посторонних микроорганизмов) и pH 4,2–4,5 штамм имеет высокую удельную скорость роста (0,12 $ч^{-1}$) и обладает конкурентоспособностью в присутствии кислотогенных микроорганизмов, развивающихся в условиях преацидификации барды. За 24 ч в этих условиях культура накапливает биомассу в количестве 0,5 г/$дм^3$ по абсолютно сухому веществу.

Выделенная чистая культура штамма дрожжей *Lachancea fermentati* имеет клетки размером (2,5–5,0)×(3,0–7,5) мкм, размножается многосторонним почкованием, образует псевдомицелий с бластоспорами и аскоспоры, сахара не сбраживает, способна к росту при величине pH среды 3–9, оптимальная температура роста 40–42°С, индивидуальные колонии на сусло-агаре белые, матовые, диаметром около 2 мм. Дрожжи рода *Lachancea* не обладают патогенностью.

Разработанная технология микробиологической переработки послеспиртовой барды позволяет получить из 1 т отхода 50–55 кг сухого белоксодержащего кормового продукта и 13–14 $м^3$ биогаза. В состав сухого кормового продукта входит биомасса метаногенных бактерий, содержащая витамин B_{12}, и белок биомассы дрожжей, выращенных на стадии преацидификации.

Приведенный анализ технологий переработки барды (табл. 4.4) свидетельствует о преимуществе в энергетическом отношении метода переработки барды в биогаз перед другими технологиями. Используя энергию биогаза на собственные технологические нужды, можно резко снизить себестоимость сопутствующего кормового продукта и гарантировать рентабельность переработки послеспиртовой барды даже при наличии энергозатратных технологических операций. Для предприятия небольшой мощности целесообразно применение технологии переработки барды, требующей минимальных капитальных вложений.

Таблица 4.4

Анализ основных технологических схем переработки барды (на 1 т)

Технология переработки барды	Выход сухого кормового продукта	Суммарные затраты энергии	Выход биогаза и его энергетический эффект
С получением сухой барды	77,7 кг, в том числе общий белок 20,6 кг	18,5 кВт · ч электроэнергии и 0,20 Гкал пара	Не производится
С получением дрожжевого концентрата	85,0 кг, в том числе общий белок 38,1 кг	34,8 кВт · ч электроэнергии и 0,12 Гкал пара	Не производится
С получением биогаза	Не производится	Затраты энергии на передачу барды и бродящей массы в аппараты незначительны	50,4 $м^3$ биогаза, из которого можно получить 334,5 кВт · ч электроэнергии или 3,2 Гкал пара
С получением биогаза и кормового продукта	37,7 кг, в том числе общий белок 9,4 кг и витамин B_{12} 3,77 г	15,6 кВт · ч электроэнергии и 0,12 Гкал пара	20,7 $м^3$ биогаза, из которого можно получить 137,5 кВт · ч электроэнергии или 1,3 Гкал пара

Таким образом, полная переработка или утилизация послеспиртовой барды является обязательным условием функционирования современного спиртового производства; использование натуральной барды в качестве кормовой добавки не является эффективным методом ее утилизации, и, несмотря на сформировавшийся в мире рынок сухой барды, большую перспективу и значимость имеют продукты микробиологической переработки барды; принимая во внимание дефицит и возрастающую стоимость энергоносителей, следует признать целесообразным применение малоэнер-

гозатратных анаэробных технологий микробиологической переработки барды, особенно технологий, позволяющих получить кормовой продукт с низкой себестоимостью, обеспечивающей окупаемость капиталовложений.

4.4. Лабораторная работа. Анаэробная переработка послеспиртовой барды с получением кормового препарата витамина B_{12}

Вопросы для самоподготовки. 1. Характеристика состава послеспиртовой барды. 2. Основные направления использования послеспиртовой барды в Республике Беларусь и за рубежом. 3. Технологии анаэробной переработки барды в метантенках с получением биогаза и кормового продукта, содержащего витамин B_{12}. 4. Сравнительная характеристика технологий переработки послеспиртовой барды. 5. Характеристика продуцентов витамина B_{12}.

Цель работы – освоение методов подготовки отходов к анаэробной переработке; моделирование производственного процесса анаэробной переработки послеспиртовой барды; овладение методом определения количественного содержания витамина B_{12} в сброженной послеспиртовой барде.

Порядок выполнения работы. Подготовить отходы к анаэробной переработке. Провести анаэробную переработку послеспиртовой барды в термофильных условиях. Определить количественное содержание витамина B_{12} в бражке.

Реактивы, материалы и оборудование: послеспиртовая барда с содержанием сухих веществ 2,5%; яблочный жмых; хлорид кобальта; мочевина; метиловый спирт; двухзамещенный фосфат аммония; 0,1 н. раствор соляной кислоты; колба на 250 $см^3$; круглодонная колба емкостью 500 $см^3$; обратный холодильник; анаэростат; центрифуга; спектрофотометр.

4.4.1. Подготовка и анаэробная переработка послеспиртовой барды

Для анаэробной переработки берут декантат послеспиртовой барды, из которой отогнан спирт, и сухой яблочный жмых

в соотношении 5 : 1. В смеси устанавливают содержание сухих веществ путем упаривания навески массой 10 г и высушивания при температуре 105°С до постоянной массы.

Для сбраживания необходимо взять 50 $см^3$ смеси барды с яблочным жмыхом с содержанием сухих веществ 2,5%. Для интенсификации процесса анаэробной переработки смесь следует инокулировать анаэробным активным илом. Эту смесь помещают в колбу на 100 $см^3$ и добавляют в нее стимуляторы синтеза кобаламинов, $г/дм^3$: $CoCl_2$ – 0,004, мочевина – 0,5, $(NH_4)_2HPO_4$ – 0,5, метанол – 5.

После тщательного перемешивания колбу помещают на 7 сут в анаэростат для анаэробной переработки, которую осуществляют бактерии анаэробного активного ила при 50°С.

4.4.2. Установление количественного содержания витамина B_{12} в бражке спектрофотометрическим методом

Культуральную жидкость тщательно перемешивают, измеряют ее объем и центрифугируют в течение 20 мин при 6000 $мин^{-1}$. Супернатант выливают, а осадок промывают тремя-четырьмя объемами дистиллированной воды, отделяя промывные воды центрифугированием. Промытую массу взвешивают и количественно переносят в колбу Эрленмейера с 30-кратным количеством кислой воды, для приготовления которой дистиллированную воду подкисляют 0,1 н. раствором соляной кислоты до pH 4,6–5,0.

Для перевода кобаламинов в водный раствор проводят гидролиз полученной суспензии на кипящей водяной бане на протяжении 40 мин. После охлаждения определяют объем гидролизата и центрифугируют его для осветления. Фугат должен иметь pH 4,6–5,0, в случае подщелачивания его подкисляют 0,1 н. раствором соляной кислоты. После этого фугат помещают под лампу (60 Вт) на расстоянии 25 см и освещают в течение 30 мин для перевода кобаламина в оксикобаламин.

Экстинкцию раствора, которая пропорциональна содержанию кобаламина, устанавливают на спектрофотометре при 530 нм относительно дистиллированной воды, толщина кюветы равна 1 см. Количественное содержание кобаламинов в культуральной жидкости C, $мкг/см^3$, рассчитывают по формуле

$$C = \frac{D_{530} \cdot 10^4 \cdot V_1}{56 \cdot V_2},$$

где D_{530} – экстинкция раствора при длине волны 530 нм; V_1 – объем гидролизата, см^3; 56 – удельный показатель (коэффициент экстинкции) для оксикобаламина при длине волны 530 нм; V_2 – количество культуральной жидкости, взятой на анализ, см^3.

4.5. Лабораторная работа. Обогащение послеспиртовой барды микробным белком

Вопросы для самоподготовки. 1. Характеристика состава послеспиртовой барды. 2. Технология получения сухой барды. 3. Технология аэробной микробиологической переработки барды с получением белоксодержащего кормового продукта. 4. Характеристика продуцентов для обогащения микробным белком.

Цель работы – освоение методов подготовки послеспиртовой барды к выращиванию продуцентов белка; моделирование производственного процесса наращивания биомассы; овладение методами контроля биомассы.

Порядок выполнения работы. Подготовить посевной материал. Определить содержание взвешенных и растворенных веществ в исходной послеспиртовой барде. Установить содержание белка в послеспиртовой барде. Подготовить послеспиртовую барду к выращиванию дрожжей. Определить содержание взвешенных и растворенных веществ в подготовленной послеспиртовой барде. Провести наращивание биомассы дрожжей на послеспиртовой барде. Определить содержание белка, взвешенных и растворенных веществ в обогащенной белком одноклеточных микроорганизмов послеспиртовой барде.

Реактивы, материалы и оборудование: послеспиртовая барда; сусло-агар; дигидрофосфат аммония; хлорид калия; ферментный препарат «Целлолюкс А», обладающий целлюлазной активностью; фильтровальная бумага; бактериологическая петля; реактивы и оборудование для определения содержания белка (см. п. 5.3.8, 5.4.6 или 5.4.7); качалочные колбы на 250 см^3; ультразвуковой генератор УЗДН-2Т; установка для фильтрования под вакуумом; фарфоровые чашки; электрическая плитка; микроскоп «Биологический».

4.5.1. Подготовка посевного материала

В качестве продуцентов белка на зерновой послеспиртовой барде используют дрожжи родов *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Trichosporon*, *Lachancea*.

Коллекционную культуру дрожжей (студент получает культуру по указанию преподавателя) с соблюдением условий асептики засевают в пробирку на скошенную агаризованную среду (сусло-агар). Пробирки помещают в термостат и инкубируют при температуре 30–32°С в течение 48 ч.

4.5.2. Подготовка послеспиртовой барды к выращиванию дрожжей

Отмеряют 250 $см^3$ послеспиртовой барды, при необходимости барду разбавляют водой, переливают в стакан на 500 $см^3$ и выдерживают на водяной бане при 95°С на протяжении 30 мин, затем охлаждают до 50–60°С. 50 $см^3$ послеспиртовой барды отбирают для количественного определения растворенных и взвешенных веществ исходной барды. Взвешенные вещества отделяют фильтрованием и устанавливают их количество взвешиванием после высушивания до полного удаления влаги при 105°С. Концентрацию растворенных веществ находят выпариванием полученного фильтрата на водяной бане с последующим высушиванием остатка при 105°С. Сухие остатки в фарфоровой чашке и на фильтре после взвешивания затем используются для определения содержания белка в послеспиртовой барде (см. п. 5.3.8, 5.4.6 или 5.4.7).

Оставшиеся 200 $см^3$ послеспиртовой барды подготавливают к ферментации путем обогащения биогенными элементами, а также обработки ферментным препаратом гидролитического действия либо ультразвуком для более полной утилизации компонентов послеспиртовой барды клетками дрожжей. В послеспиртовую барду вносят источники биогенных элементов – 1,5 г/$дм^3$ $NH_4H_2PO_4$ и 0,3 г/$дм^3$ KCl. В качестве источника ферментов вводят ферментный препарат «Целлолюкс А», обладающий целлюлазной, ксиланазной и глюканазной активностью, в количестве 0,25–1,00 $см^3$ 1%-ного раствора ферментного препарата на 100 $см^3$ послеспиртовой барды. Обработку ультразвуком проводят с применением ультразвукового генератора УЗДН-2Т (см. п. 4.5.3).

Подготовленную послеспиртовую барду разливают в три качалочные колбы по 50 $см^3$, колбы закрывают крышечками из алюминиевой фольги и стерилизуют 40 мин при давлении 0,12 МПа. Со-

держимое двух качалочных колб используется для выращивания продуцента белка (см. п. 4.5.4), содержимое третьей колбы – для установления количества растворенных и взвешенных веществ подготовленной послеспиртовой барды. По разнице между значениями, полученными для необработанной и подготовленной послеспиртовой барды, оценивают эффективность разрушения клетчатки.

По окончании культивирования содержимое двух качалочных колб также анализируется на количественное содержание растворенных и взвешенных веществ культуральной жидкости. Сухие остатки в фарфоровой чашке и на фильтре после взвешивания затем используются для определения содержания белка в культуральной жидкости. По разнице между значениями растворенных и взвешенных веществ, полученными для обработанной раствором фермента послеспиртовой барды и культуральной жидкости, определяют степень преобразования органических веществ барды в белок одноклеточных.

4.5.3. Ультразвуковая обработка послеспиртовой барды

Ультразвуковую обработку осуществляют с применением ультразвукового генератора УЗДН-2Т мощностью 400 Вт при частоте колебаний 22 кГц. Продолжительность ультразвуковой обработки проб барды определяется количеством энергии, вводимой в пробу в расчете на единицу массы сухого вещества (СВ). Рекомендуемая величина вводимой энергии составляет 20 000–80 000 кДж/кг СВ послеспиртовой барды.

Количество вводимой энергии при ультразвуковой обработке E, кДж/кг СВ, рассчитывают по следующей формуле:

$$E = \frac{N \cdot T \cdot 1000 \cdot 100}{V \cdot p \cdot c},$$

где N – мощность ультразвукового генератора, Вт; T – продолжительность обработки, с; V – объем обрабатываемой пробы, дм^3; p – плотность суспензии, кг/м^3; c – концентрация сухих веществ в суспензии, %.

Образцы исходной барды и барды после ультразвуковой обработки микроскопируют при увеличении в 400 раз, отмечают степень разрушения дробины.

4.5.4. Выращивание дрожжей на подготовленной послеспиртовой барде

Засев качалочных колб проводят в условиях асептики. В пробирку с культурой вливают 6–8 см^3 стерильной подготовленной

послеспиртовой барды из колбы, бактериологической петлей снимают культуру дрожжей с поверхности агаризованной среды и полученную суспензию возвращают в качалочную колбу. Все операции осуществляют около пламени горелки. Засеянные колбы помещают в шейкер-инкубатор и выращивают дрожжи при температуре 30–32 либо 42°С в течение 2 сут.

4.5.5. Расчет эффективности использования компонентов послеспиртовой барды продуцентом белка

Эффективность перевода в растворенное состояние взвешенных веществ (клетчатки) послеспиртовой барды, обработанной ферментным препаратом или ультразвуком $Э_{обр}$, %, оценивают по формуле

$$Э_{обр} = \frac{(ВВ_2 - ВВ_1) \cdot 100}{ВВ_1},$$

где $ВВ_2$ – содержание взвешенных веществ в подготовленной к культивированию продуцента белка послеспиртовой барде, г/дм^3; $ВВ_1$ – содержание взвешенных веществ в исходной послеспиртовой барде, г/дм^3.

Прирост дрожжевой массы в результате использования растворенных веществ послеспиртовой барды $Э_{обогащ}$, %, устанавливают по формуле

$$Э_{обогащ} = \frac{(ВВ_3 - ВВ_2) \cdot 100}{РВ_2 - РВ_3},$$

где $ВВ_3$ – содержание взвешенных веществ в обогащенной белком одноклеточных послеспиртовой барде, г/дм^3; $РВ_2$ – содержание растворенных веществ в подготовленной к культивированию продуцента белка послеспиртовой барде, г/дм^3; $РВ_3$ – содержание растворенных веществ в обогащенной белком одноклеточных послеспиртовой барде, г/дм^3.

Увеличение содержания белка в послеспиртовой барде после ее обогащения белком одноклеточных микроорганизмов $Э_б$, %, рассчитывают по формуле

$$Э_б = \frac{(Б_2 - Б_1) \cdot 100}{Б_1},$$

где $Б_2$ – содержание белка в обогащенной белком одноклеточных послеспиртовой барде, % от сухой массы; $Б_1$ – содержание белка в исходной послеспиртовой барде, г/дм^3.

5 БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ ПЕРЕРАБОТКА РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ

5.1. Получение биотоплива

5.1.1. Производство биоэтанола

Биоэтанол – жидкое спиртосодержащее топливо. В отличие от спирта для изготовления алкогольных напитков топливный этанол не содержит воды и производится методом укороченной дистилляции (две ректификационные колонны вместо пяти), поэтому содержит метанол и сивушные масла, что делает его непригодным для применения в пищевых целях.

Вместе с тем этанол не загрязняет окружающую среду, грунтовые воды, он растворим в воде, разлагается естественным образом при разливе топлива быстрее других его составляющих.

Для производства биоэтанола, предназначенного для добавления в бензин или потребления в чистом виде, традиционно применяют следующие основные виды сырья: в Бразилии – сахарный тростник, в США, Европе – кукурузу, сорго. Для России оптимальными культурами являются пшеница, ячмень, рожь, а также кукуруза, сахарная свекла, топинамбур. Однако наиболее перспективным в России для производства этанола считается целлюлозосодержащее сырье (древесина, солома, отходы обработки зерна и др.).

При использовании зерна, сахарной свеклы (патоки, сахара) из сырья, выращенного на 1 га, можно получить в среднем 2560 дм^3 этанола по цене 0,5–0,6 евро за 1 дм^3. Топливный эквивалент 1 дм^3 этанола равен 0,65–0,66 дм^3 бензина.

Этанол в качестве моторного топлива наиболее широко применяется в Бразилии, что обусловлено значительными возможностями его производства. Более 90% автомобилей в стране работают на моторном топливе, содержащем этанол. В 1991 г. была принята программа, предусматривающая обязательное использование

5% этанола в составе бензина. В 2000 г. содержание этанола было доведено до 20%. В ближайшие годы этанол будет составлять в среднем около 24% в топливном балансе страны. Бразилия является крупнейшим в мире производителем этанола (до 16 млн. т в год). Практически весь этанол в Бразилии получают ферментацией сахарного тростника или черной патоки. Около 240 тыс. т топливного этанола Бразилия импортирует из других стран. Все это стало возможным благодаря национальной программе по широкомасштабному применению этанола в качестве автомобильного топлива и субсидиям правительства, которые получили соответствующую финансовую поддержку Мирового банка. В последнее время Бразилия использует в качестве топлива смеси, в которых содержание этанола составляет уже 26% в бензине и 3,3% в дизельном топливе.

Огромный опыт производства и применения биоэтанола накоплен США. В 2006 г. США опередили Бразилию, произведя 18,5 млн. т биоэтанола из кукурузы и сорго. Благодаря производству этанола США ежегодно экономят около 1,5 млрд. долл. на импорте нефти, несмотря на то, что стоимость этанола выше стоимости бензина.

В соответствии с Законом «О возобновляемых топливах для обеспечения энергетической безопасности США» содержание этанола в бензине должно быть увеличено с 1,3 до 5,0%. При производстве бензина в количестве 380–400 млн. т это потребует производства этанола на уровне 15–20 млн. т. В США планируется утроить выработку этанола, этанол должен заменить бензин на 25%, сейчас его доля в топливе для автомобилей составляет до 10%. Из валового сбора кукурузы на производство этанола может быть направлено 25% урожая. При использовании высококрахмалистых сортов кукурузы (при 70% крахмала в зерне) из 1 т получают 0,38 т биоэтанола.

По экологическим соображениям и для замены нефтепродуктов производство и потребление этанола растет во многих странах мира. Национальные программы по производству и применению биоэтанола действуют во многих странах: в Китае, Индии, Франции, России, Германии, ЮАР, Великобритании, Испании.

В России до последнего времени вопрос о значительном производстве жидкого биотоплива остро не стоял. Вместе с тем, по оценкам экспертов, с сырьем для производства биоэтанола могут использоваться ресурсы (сверх потребностей на продовольственные и кормовые цели) таких культур, как пшеница, рожь, сахарное

сорго, сахарная свекла, картофель, патока, отходы зерновые, а также опилки, солома и др.

По оценкам специалистов, потребность в этаноле, который бы применялся в качестве добавок к бензину, согласно действующим стандартам, составляет около 320 тыс. т, или около 1% объема производства бензина, в том числе 200 тыс. т этанола гидролизного и 120 тыс. т синтетического.

Россия располагает значительным резервом посевных площадей, которые можно использовать для посевов технических культур, направляемых для производства биоэтанола. Выбор таких культур весьма широк, так как этанол можно производить из любой биомассы. Однако выход этанола из 1 т биомассы будет разным, $дм^3$: из картофеля – 100, из овса – 320, из ячменя – 380, из пшеницы и ржи – 400, из кукурузы – 420, из риса – 456, из сахарного сорго – 500.

5.1.2. Производство биобутанола

Бутанол-1 (*н*-бутанол, *н*-бутиловый спирт) C_4H_9OH – представитель одноатомных спиртов. Известны нормальный первичный бутиловый спирт $CH_3(CH_2)_3OH$ и его изомеры: нормальный вторичный бутиловый спирт $CH_3CH_2CH(OH)CH_3$, изобутиловый спирт $(CH_3)_2CHCH_2OH$, третбутиловый спирт (триметилкарбинол) $(CH_3)_3COH$.

В промышленности бутанол получают путем химического синтеза (синтетический бутанол) – оксосинтезом из пропилена с использованием никель-кобальтовых катализаторов при давлении 1,0–1,5 МПа, из ацетальдегида через ацетальдоль и кротоновый альдегид, который гидрируют на медных, медно-хромовых или никелевых катализаторах. В настоящее время бутанол производят также из нефти гидролизом галогеналканов или гидролизом и гидратацией алкенов. Альтернативным способом получения бутанола является микробиологический синтез путем сбраживания углеводных сред, полученных из различных видов сырья: зерновых, сахарного тростника, свеклы, кукурузы, патоки (биобутанол I поколения), целлюлозы растений (биобутанол II поколения).

Бутанол применяют как растворитель в лакокрасочной промышленности, в производстве смол и пластификаторов, в синтезе многих органических соединений. Бутанол может использоваться в топливных элементах, как сырье для производства водорода, а

также в качестве добавки к бензину или как самостоятельное топливо для транспортных средств. Его можно смешивать с бензином в более высоких пропорциях, чем этанол, кроме того, для применения таких смесей не требуется модификация системы формирования воздушно-топливной смеси в существующих автомобилях. Энергетическая ценность бутанола выше, чем этанола или метанола и примерно на 10% больше, чем бензина. Таким образом, биобутанол более экономичен, чем смесь этанола с бензином, он увеличивает пробег автомобиля на единицу расходуемого топлива. Достоинством бутанола является и то, что он безопаснее в использовании, поскольку менее летуч, чем этанол и бензин. Бутанол может полностью заменять бензин, тогда как этанол может применяться только как добавка к бензину.

Классическим продуцентом биобутанола являются бактерии *Clostridium acetobutylicum*, реализующие процесс ацетонобутилового брожения, основные продукты которого – бутанол, ацетон и этанол в соотношении около 6 : 3 : 1 соответственно. Это соотношение не является строго постоянным и может изменяться в сторону увеличения выхода того или иного продукта брожения. При этом на выход растворителей и долевое соотношение целевых продуктов в значительной степени влияет состав сырья, используемого для брожения. Побочными продуктами ферментации являются водород, изопропанол, уксусная, молочная, пропионовая и масляная кислоты, а также диоксид углерода и липиды.

На первой стадии брожения образуются масляная, пропионовая, молочная и уксусная кислоты. При снижении значения pH среды менее 5 и повышении концентрации масляной кислоты более 2 г/дм^3 инициируется синтез растворителей – бутанола, ацетона, изопропанола и этанола. Содержание бутанола в ферментационной среде не должно быть более 2% (обычно не более 1,3%), так как при более высоких его концентрациях метаболизм продуцента существенно замедляется. Производительность культуры не превышает 4,46 г/(дм^3 · ч), выход бутанола из глюкозы невелик и составляет 15–25%. В связи с низкой рентабельностью производства бутанол, полученный данным способом, не нашел применения в качестве топлива. Однако в настоящее время вследствие появления новых экономичных технологий производства резко возрос интерес к получаемому микробиологическим путем бутанолу и его использованию в качестве биотоплива.

В данный момент основными направлениями исследований в области получения биобутанола в Великобритании, США, Германии, Китае и Японии являются конструирование новых штаммов ацетонобутиловых бактерий методами генетической инженерии и разработка новых технологических приемов выделения конечных целевых продуктов. Наиболее перспективными продуцентами считаются *Clostridium beijerinkii*, *C. tyrobutyricum* и *C. acetobutylicum*.

Компанией Environmental Energy (США) разработана технология биобутанола и создана экспериментальная установка по его производству из масляной кислоты, получаемой биотехнологическими методами. Непрерывный анаэробный ферментационный процесс реализуется в две ступени, на которых используют иммобилизованные культуры бактерий. На первой ступени происходит образование масляной кислоты из раствора углеводов при помощи *Clostridium tyrobutyricum*. Кроме *C. tyrobutyricum*, для осуществления ацидогенеза могут быть задействованы также *C. thermobutyricum*, *C. butyricum* и другие виды бактерий рода *Clostridium*. Биосинтез бутанола на второй стадии могут осуществлять *Clostridium acetobutylicum*, *C. beijerinkii* и др.

Технология позволяет достичь производительности по бутанолу 4,64 г/(дм^3 · ч), выход бутанола составляет 42% от веса глюкозы. Продуктами ферментации, кроме бутанола, являются углекислый газ, водород, масляная кислота. Разработанный способ получения бутанола позволяет избежать образования побочных продуктов (уксусной, молочной, пропионовой кислот, ацетона, изопропанола и этанола). Образующийся в процессе водород также является альтернативным топливом. Таким образом, новая технология обеспечивает получение из единицы сырья на 42% больше энергии, чем при производстве этанола, из них 25% приходится на бутанол и 18% – на водород.

Наиболее энергоемким и дорогостоящим звеном в технологии получения бутанола является выделение его и других органических растворителей из культуральной среды. Для этого используют дистилляцию, разделение на мембранах, сепарацию с помощью сорбентов, вымораживание. Недостатками всех известных способов выделения являются высокая энергоемкость и необходимость относительно частой замены или восстановления исходных свойств функциональных элементов – мембран или твердых

сорбентов. Для снижения энергопотребления разработаны технологии, предусматривающие совмещение процессов брожения с одновременной отгонкой органических растворителей из культуральной жидкости при сохранении жизнеспособности и бродильной активности клеток продуцента. С этой целью производят периодическое понижение давления в ферментаторе. Способ позволяет повысить выход бутанола и изменять соотношение целевых продуктов в процессе биосинтеза.

Еще одним направлением совершенствования производства биобутанола является использование возобновляемых непищевых источников сырья – целлюлозосодержащих отходов сельского хозяйства и лесной промышленности (соломы, торфа, опилок).

Процесс производства бутанола из сельскохозяйственных отходов включает четыре этапа:

– предварительная обработка с целью разрушения клеточной структуры;

– ферментативный гидролиз гемицеллюлозы и целлюлозы с получением гексозных и пентозных сахаров;

– ферментация сахаров в бутанол при помощи чистой культуры анаэробных бактерий;

– выделение бутанола.

Согласно проведенным в США исследованиям, последние три этапа возможно осуществлять в одном аппарате. Рассматривается также вопрос о повышении рентабельности этапа гидролиза путем замены дорогостоящих ферментов смешанной культурой микроорганизмов, способной ферментировать предварительно обработанное сырье с образованием масляной кислоты. Культуры ацидогенных бактерий предполагается получить из осадка метантенков и других источников (овечьего рубца и т. д.). Стадия получения бутанола из масляной кислоты будет осуществляться при помощи монокультуры бактерий рода *Clostridium beijerinckii* P206.

ОАО «Корпорация «Биотехнологии» (Россия) разработана и внедрена технология, в соответствии с которой доступность целлюлозы как сырья для ферментативной обработки повышается за счет ее измельчения до микронных размеров. По данной технологии в 2008 г. на опытно-промышленной установке был успешно произведен первый в мире биобутанол из древесины, который предполагается использовать в качестве топлива.

5.1.3. Производство биодизеля

Биодизель – биотопливо на основе растительных или животных жиров (масел), а также продуктов их этерификации.

Биодизель применяется на автотранспорте в чистом виде и в качестве различных смесей с дизельным топливом. В разных странах действуют различные стандарты использования биодизеля: допускается его содержание в топливе от 0,5 до 20,0%. Применение смесей не требует внесения изменений в двигатель.

Сырьем для производства биодизеля служат растительные масла, такие как рапсовое, соевое, касторовое, пальмовое, кокосовое, реже – эфирные масла различных растений. Кроме того, используется отработанное растительное масло, животные жиры, рыбий жир и т. д.

При производстве биодизеля растительное масло переэтерифицируют метанолом (реже – этанолом или изопропиловым спиртом) в присутствии гидроксида калия или натрия при температуре 60°С и нормальном давлении. Для увеличения скорости реакции обычно повышают температуру, вводят дополнительное количество спирта или добавляют катализаторы. Процесс проводят в условиях интенсивного перемешивания, что обусловлено ограниченной взаимной растворимостью спирта и масла. Для получения качественного продукта после прохождения реакции переэтерификации содержание метиловых эфиров должно быть выше 96%. Полученную смесь отстаивают. Нижние фракции представляют собой глицериновую фазу. Легкие верхние фракции – метиловые эфиры жирных кислот (МЭЖК) – очищают от избытка метанола и продуктов омыления и высушивают. Полученный биодизель хранят не более 3 месяцев, так как при более длительном хранении его качество ухудшается из-за окисления. Побочный продукт производства – глицерин – находит широкое применение для производства технических моющих средств (например, мыла), используется в лакокрасочной, а после глубокой очистки – в фармацевтической промышленности.

Биодизель имеет более высокое цетановое число (определяет промежуток времени от впрыска топлива в цилиндр до начала его горения), что обеспечивает более спокойное и плавное горение топливной смеси. При оптимальном значении этого показателя 45–55 для биодизеля цетановое число составляет не менее 51, в то время как для минерального дизельного топлива – лишь 42–45.

Высокая температура воспламенения биодизеля (более 150°С) обеспечивает ему лучшие противопожарные технические характеристики по сравнению с классическим дизельным топливом, что делает его применение относительно безопасным.

Производство МЭЖК и побочных продуктов из рапса в 2,5 раза энергетически более выгодно, чем нефтяного дизельного топлива и второстепенной продукции.

Хорошие смазочные свойства биодизеля позволяют увеличить срок службы двигателя и топливного насоса в среднем на 60%.

Негативным моментом использования биодизеля является необходимость его подогрева на пути из топливного бака в топливный насос в холодное время года. Кроме того, это топливо является благоприятной средой для развития микроорганизмов, которые активно заселяют стенки топливного бака, могут забивать топливные фильтры.

Биодизель обладает хорошими экологическими характеристиками. По сравнению с нефтяным дизельным топливом биотопливо на основе продуктов переработки рапсового масла позволяет наполовину уменьшить дымообразование при работе двигателя и исключить из выхлопных газов полициклические ароматические углеводороды, которые являются высококанцерогенными соединениями. В выбросах отсутствуют также окись углерода (угарный газ), углеводороды и соединения серы, а выброс оксидов азота снижается на 20–22%.

CO_2-баланс биотоплива более благоприятен, чем дизельного. При его сгорании выделяется такое же количество углекислого газа, которое было потреблено из атмосферы растением, являющимся исходным сырьем для производства масла. При замене дизельного топлива биотопливом эмиссия «парниковых» газов снижается.

Биотопливо имеет высокую биологическую разлагаемость и в течение 10–15 сут практически полностью подвергается биодеградации почвенными и водными микроорганизмами на неагрессивные по отношению к природным объектам компоненты, что позволяет говорить о минимизации загрязнения окружающей среды.

Однако производство биодизеля имеет и отрицательные стороны. Для выращивания сырья отчуждаются большие земельные площади, на которых нередко используют повышенные дозы средств защиты растений, что может приводить к снижению качества почв.

С другой стороны, жмых, получаемый в процессе производства растительного масла, применяется в качестве корма для скота, что позволяет более полно утилизировать биомассу растения.

Получение биодизеля позволяет ввести в оборот неиспользуемые земли, создать новые рабочие места в сельском хозяйстве, машиностроении, строительстве и т. д.

Производство биодизеля в мире составляет около 20 млн. т, здесь лидируют такие страны, как США, Бразилия, Аргентина, Германия, Франция, Испания. В Европе более 2 млн. т биотоплива получают в основном из рапсового масла, на эти цели расходуется примерно треть урожая рапса.

В Беларуси биодизельное топливо на основе рапсового масла начали производить в 2007 г. на ОАО «Гродно Азот». В 2013 г. выпуск метиловых эфиров жирных кислот был налажен на ОАО «Могилевхимволокно». Мощность крупных предприятий составляет 40–60 тыс. т в год. Кроме того, в различных регионах Республики Беларусь функционируют более мелкие производства (2–10 тыс. т в год). Производимый ими биодизель служит добавкой к дизельному топливу, содержание МЭЖК в котором составляет 5%. Полученное биотопливо реализуется в сети автозаправочных станций РУП «ПО «Белоруснефть».

5.2. Получение кормового белка на растительных отходах

Важным условием полноценного кормления животных является обеспеченность кормов белком. Для удовлетворения физиологической потребности животных в белке на одну кормовую единицу содержание перевариваемого протеина должно быть не менее 105–115 г. Кормовая единица – это количество корма, по питательности соответствующее 1 кг зерна овса среднего качества, из которого в организме крупного рогатого скота при откорме предполагается получение 150 г жира (1414 ккал, или 5,95 МДж).

Фактическая обеспеченность кормов белком гораздо ниже требуемой, и дефицит перевариваемого протеина составляет 15–20 г на одну кормовую единицу. Это снижает продуктивность животных, ведет к перерасходу кормов на 20%. Из-за дефицита белка

недобор продукции животноводства в целом по республике ежегодно составляет 15–35%, а ее себестоимость возрастает в 1,5 раза.

Потребность в кормовом белке для животноводства и птицеводства в нашей стране оценивается в 120 тыс. т в год. Только птицеводческим предприятиям «Белптицепрома» в год необходимо 90–100 тыс. т соевого и подсолнечникового шрота, 30–35 тыс. т рыбной и мясокостной муки. Потребность в кормовых дрожжах при введении их в рацион птицы, согласно нормам, составляет 26–30 тыс. т.

Частично решить проблему недостатка белка можно путем использования продуктов микробиологического синтеза (бактериальной, дрожжевой и грибной биомассы, полученной на различных субстратах). По содержанию сырого протеина и незаменимых аминокислот белковые корма, полученные таким способом, превосходят растительные высокопротеиновые кормовые средства и по своему составу приближаются к высокоценным компонентам животного происхождения – рыбной и мясокостной муке.

Важным фактором является то, что питательным субстратом для выращивания микроорганизмов – продуцентов белка может служить доступное, дешевое сырье – отходы сельскохозяйственного производства, пищевой, целлюлозно-бумажной и деревообрабатывающей промышленности, а также бытовые отходы (газеты, бумага) и т. д.

5.2.1. Сырье для получения кормового белка

Отходы сельского хозяйства (солома злаков, початки, стебли и листья кукурузы, стебли и корзинки подсолнечника, ботва различных корнеплодов и др.) обладают низкой кормовой ценностью из-за наличия трудногидролизуемых полисахаридов и невысокого содержания белка. Исключение составляют семена бобовых культур, где содержание белка достигает 50%.

Отходы пищевой промышленности составляют 60–80% от перерабатываемого сырья, а в некоторых случаях – до 95%. Они более богаты питательными веществами, безвредны, легче поддаются ферментативной и микробной биоконверсии, различным видам предварительной обработки.

Зерноперерабатывающая промышленность дает ценные для биоконверсии отходы, образующиеся при помоле зерна (отруби и др.). При выработке круп из гречихи, овса, проса, ячменя суммарное

количество отходов составляет в среднем 35% от перерабатываемого зерна, при помоле пшеницы – не менее 12%. Пшеничные отруби содержат около 18% белка, ржаные – 13,5%. Кормовую ценность зерновых отходов в результате биоконверсии можно повысить в 2–2,5 раза.

При ***получении спирта из крахмалсодержащего сырья*** общее количество отходов составляет 30–35% к массе сырья, в основном это зернокартофельная послеспиртовая барда. В сухом веществе барды содержится около 39% сырого протеина. Основную массу барды скармливают животным в натуральном виде. Однако более рациональным способом утилизации является производство на ее основе кормовых дрожжей.

В ***производстве пива*** в отходы переходит около 25% сырья. Для обогащения белком подходят пивная солодовая дробина, зерновые отходы, сплав зерна.

Сахарные заводы дают следующие виды отходов: свекловичный жом, мелассу, рафинадную патоку, фильтрационный осадок, свекловичный бой. Наибольший интерес представляет жом, составляющий 83% к массе переработанной свеклы. Жом включают в состав кормов, применяют в микробиологической промышленности как компонент питательных сред.

Основными отходами ***крахмалопаточной промышленности*** являются картофельная мезга и клеточный сок (11–45 и 50% к массе картофеля соответственно). В мезгу переходит до 7% СВ картофеля, из них 40–60% составляет крахмал. Клеточный сок содержит в среднем 6% СВ.

Из отходов ***масложировой промышленности*** для биоконверсии может быть использована подсолнечная лузга, образующаяся в количестве до 30% к массе семян подсолнечника.

Для получения кормового белка применяют необработанное растительное сырье (прямая биоконверсия) или сырье, подвергнутое предварительной обработке механическими, химическими, электрохимическими, радиационными методами, а также с помощью ферментных препаратов.

Прямая биоконверсия целесообразна при переработке жидких субстратов с достаточно высоким содержанием легкоусваиваемых соединений углерода и азота. Однако в последнее время во многих странах мира возрос интерес к проблеме получения кормового белка путем культивирования микроорганизмов на

твердых питательных средах, чаще всего на целлюлозосодержащих промышленных и городских отходах. Такой процесс является более экономически выгодным по сравнению с производством кормовых дрожжей на растительных гидролизатах, так как исключает дорогостоящий процесс кислотного или ферментативного гидролиза. Прямую биоконверсию твердых субстратов осуществляют при помощи микроорганизмов с мощными ферментными системами, способными воздействовать непосредственно на биополимеры сырья.

Технология биоконверсии растительного сырья с целью получения белка включает следующие стадии: подготовка растительного сырья к биоконверсии, выбор штамма-продуцента, способа и оптимальных параметров культивирования, промышленное культивирование, получение товарного продукта (углеводно-белкового корма или биомассы микроорганизмов).

5.2.2. Подготовка растительного сырья к биоконверсии

Из числа содержащихся в растительных отходах углеводов сравнительно легко гидролизуются ферментами микроорганизмов крахмал и пектиновые вещества, промежуточное положение занимает гемицеллюлоза, а наиболее трудногидролизуемы целлюлоза и лигнин. Соответственно, субстраты с высоким содержанием целлюлозы и лигнина (древесина, солома, ботва, одревеснevшие части растений) при прямой биоконверсии лишь незначительно обогащаются белком. Так, при поверхностном выращивании актиномицетов, микромицетов на древесных отходах после механического размола содержание белка составляет около 14%. В то же время накопление белка актиномицетами на целлобиозе достигает 59%, грибами – 40%.

Для повышения доступности компонентов сырья действию микробных ферментов и степени конверсии в белок трудногидролизуемые виды отходов подвергают предварительной обработке различными способами.

Крахмалсодержащее сырье подвергают ***термообработке***, режим которой должен обеспечить наиболее полный переход крахмала в растворимое состояние и образование минимального количества побочных продуктов. Температура обработки зависит от степени измельчения: для целого зерна требуется нагревание до 140–150°С, для измельченного сырья достаточно 120–126°С. Наи-

более перспективны для измельчения зерносырья роторно-пульсационные аппараты.

Целлюлозосодержащее и пентозансодержащее сырье предварительно обрабатывают физическими и химическими методами.

Механическое измельчение представляет собой наиболее простой способ предварительной обработки и позволяет увеличить удельную поверхность материала, что приводит к возрастанию скорости превращения субстратов. При сильном измельчении (например, на вибромельнице) структура сырья меняется на молекулярном уровне – степень полимеризации целлюлозы снижается с 1200 до 900 глюкозных единиц (количество остатков глюкозы в полимере).

Механические методы предварительной обработки часто сочетают с ферментативными и химическими.

Ферментативная обработка. Наиболее перспективны для этого вида обработки целлюлозосодержащие материалы с низким содержанием нецеллюлозных компонентов (лигнина): плодоовощные отходы, некондиционное фуражное зерно, лигноцеллюлозные материалы (солома, отходы подсолнечника и др.), отходы целлюлозно-бумажной промышленности, сбора и обработки льна и др.

Ферментные препараты выбирают в соответствии с составом сырья. Так, гидролиз целлюлозосодержащего и пентозансодержащего сырья осуществляют комплексом целлюлолитических, гемицеллюлазных и лигнолитических ферментов (например, «Целловиридин», «Пектофоетидин» и др.). Концентрация сахаров в ферментолизатах измельченной соломы составляет 5–15%. Степень конверсии отходов целлюлозно-бумажного производства (мелкого волокна от бумагоделательных машин) при ферментативном гидролизе достигает 60%, концентрация глюкозы в ферментолизатах – до 7%, целлобиозы – до 4%. Однако процесс ферментативного гидролиза достаточно длителен, его продолжительность – около 5 сут.

Для гидролиза плодоовощных отходов, содержащих значительные количества пектиновых веществ и целлюлозы, используют комплекс пектиназ и целлюлаз. Для обработки фуражного зерна, главные компоненты которого – крахмал, белок, глюкан, арабиноксилан, необходим комплекс амилазы, протеазы, глюканазы и ксиланазы. Такой комплекс можно получить, например, сочетанием препаратов «Амилосубтилин», «Протосубтилин» и «Целловиридин» или «Вильзим АК». Разработанные технологии

обеспечивают степень конверсии полисахаридов 61–99% в зависимости от состава жидкой фазы, вида зерносырья и используемых ферментных препаратов.

Качество кормовых белковых продуктов, получаемых на ферментолизатах, зависит от применяемых культур микроорганизмов, а также режима предварительной обработки сырья. Содержание сырого протеина колеблется от 27 до 50%, белка – от 21 до 34%. Например, на ферментолизате зерна, полученном путем двухступенчатого гидролиза термостабильной α-амилазой и глюкоамилазой, дрожжи *Candida blankii* обеспечивают выход сырого протеина около 50%. В то же время при выращивании пекарских дрожжей на ферментолизатах соломы содержание сырого протеина в полученном корме значительно ниже и составляет около 18%.

Наивысшие показатели (52% сырого протеина) получены при использовании ассоциации бактериальных культур *Acetobacter methylicum* и *A. methylovorans* с дрожжами *Saccharomyces cerevisiae* (*diastaticus*) ВКПМ-1218 на пульпе ферментолизата отрубей с концентрацией сухих веществ 11%.

Хорошие результаты дает также культивирование дрожжей на ферментолизатах пивной дробины, свекловичного жома, льняной костры, подсолнечной лузги.

При использовании нестерильных сред обработку сырья ферментами можно совмещать с процессом выращивания микроорганизмов.

Химическая предварительная обработка растительного сырья применяется для разделения комплексов структурных полимеров растений. При этом происходит преимущественная экстракция какого-либо компонента, а также расщепление полимеров на низкомолекулярные продукты, служащие микроорганизмам источниками питания.

В качестве химических агентов чаще всего используют кислоты и щелочи. Мягкая обработка этими агентами (в течение 1–4 ч при температуре не выше 100°С и атмосферном давлении) применяется для перевода в растворимое состояние гемицеллюлозы, пектиновых веществ, лигнина. Более жесткий режим обработки дает возможность расщепить биополимеры на блоки различной величины, вплоть до мономеров.

Недостаток химической обработки состоит в том, что она дает побочные продукты реакции, обладающие токсическим действием на микроорганизмы. Так, при кислотном гидролизе растительного материала образуются метанол, формальдегид, ацетон, фенолы,

фурфурол и его производные, муравьиная кислота. Как кислотный, так и щелочной гидролиз приводит к деградации аминокислот, образованию продуктов их конденсации с углеводами и другими соединениями.

Жесткий кислотный гидролиз целлюлозосодержащего сырья лежит в основе технологии дрожжей, выращиваемых на гидролизатах древесины (см. с. 208–217 учебного пособия «Экологическая биотехнология» (Н. С. Ручай, Р. М. Маркевич, 2006)). Изучение механизма кислотного гидролиза различных групп полисахаридов растительного сырья позволило разработать рациональную технологию раздельного получения пентозных и гексозных смесей моносахаров с минимальными примесями нежелательных продуктов. Такое разделение очень важно, поскольку на гексозном гидролизате можно выращивать экологически безопасные дрожжи рода *Saccharomyces*, в то время как на смеси пентоз и гексоз или на чистых пентозах – только дрожжи рода *Candida*, которые могут вызывать аллергические реакции у людей и животных.

Для повышения пищевой ценности древесины быстрорастущих пород деревьев, подсолнечной лузги и других грубых кормов применяют ***метод «парового взрыва»***. Он состоит в том, что влажные древесные опилки подвергают воздействию повышенного давления и температуры 150–230°С. При резком снижении давления опилки превращаются в рыхлую целлюлозосодержащую массу. Конверсия древесины березы с помощью парового взрыва (4 мин при 230°С) дает выход растворимых веществ до 40%. Последующий ферментативный гидролиз с помощью целлюлолитических ферментов (в течение суток при pH 4,5 и температуре 40°С) позволяет перевести в растворимое состояние 84% содержащихся в древесине сахаров, причем пентозные сахара полностью переходят в мономерные формы, а выход глюкозы составляет 66% от теоретического. Полученные гидролизаты можно использовать для получения высокобелковой биомассы дрожжей рода *Candida*.

5.2.3. Выбор микроорганизмов – продуцентов белка

Выбор продуцента определяется общим содержанием белка в биомассе, аминокислотным составом и усваиваемостью белка, содержанием нежелательных компонентов (нуклеиновых кислот, некоторых жирных кислот, полисахаридов с аллергенными свойствами).

В качестве продуцентов микробного белка на растительных отходах можно использовать бактерии, дрожжи, низшие и высшие мицелиальные грибы. В основном применяют культуры дрожжей (роды *Candida*, *Endomycopsis* и др.) и несовершенных грибов (роды *Fusarium*, *Penicillium*, *Trichoderma* и др.). Возможно использование базидиомицетов (роды *Schizophyllum*, *Coriolus*, *Panus*, *Pleurotus* и др.).

При культивировании на жидких средах предпочтение отдают дрожжевым культурам, как наиболее изученным и не требующим, в отличие от бактерий, асептических условий культивирования. Использование мицелиальных грибов в крупнотоннажном производстве белка ограничивается их низкой удельной скоростью роста (0,12–0,15 $ч^{-1}$). Основным недостатком процессов прямой биоконверсии крахмала, муки и зерносырья различных видов, картофельной мезги при глубинном и поверхностном культивировании мицелиальных грибов и актиномицетов является их длительность (до 5 сут).

Для прямой биоконверсии растительного субстрата в белковый кормовой продукт можно использовать один штамм микроорганизмов, обладающий комплексом ферментов для гидролиза субстрата и синтеза белка. Например, на отходах, содержащих крахмал, культивируют штаммы дрожжей *Lypomyces kononenkoae*, продуцирующие α-амилазу и глюкоамилазу. Гриб *Polyporus speamosus* при твердофазной ферментации фуражной муки дает продукт с содержанием белка 15%. При глубинном культивировании микроскопических грибов на нативной и обработанной паром соломе содержание белка в продукте достигает 14–21%, причем наилучшие результаты получены для *Trichoderma lignorium*.

Известны технологии получения препаратов с содержанием сырого протеина 45–55% на основе отходов переработки картофеля (клеточного сока и мезги) при помощи грибов рода *Penicillium*.

Для прямой биоконверсии зерносырья (отруби, нестандартное зерно) большой интерес представляют дрожжи рода *Saccharomyces*. Например, штамм *S. cerevisiae* (*diastaticus*) ВКПМ Y-1218, обладающий амилолитической активностью, способен при выращивании на водной пульпе в течение 10–20 ч (pH 4,5–5,0, температура 32–34°С) ассимилировать крахмал отрубей наряду с моно- и дисахаридами.

В других случаях перспективно использование ассоциаций из двух и более штаммов, среди которых есть микроорганизмы с вы-

сокой активностью гидролитических ферментов и микроорганизмы, активно синтезирующие белок. Например, при биоконверсии соломы применяют гидролизующие ее грибы рода *Penicillium*, а на образовавшихся продуктах гидролиза выращивают дрожжи – продуценты белка. Совместное культивирование культур *Lipomyces kononenkoae* (или *Schwanniomyces alluvius*), обладающих амилолитической активностью, и *Candida scottii* позволяет достичь содержания белка в биомассе при биоконверсии пшеничных отрубей 14%, пшеницы – 31%. Содержание белка в препарате, полученном при культивировании дрожжей *Endomycopsis fibuligera* и бактерий рода *Brevibacterium*, составляет около 12%. Прямая ферментация послеспиртовой барды с добавлением 6% муки ассоциацией дрожжей *Saccharomycopsis fibuligera* и бактерий *Rhodococcus erhytropolis* позволяет получить содержание протеина до 48%.

Бактерии, актиномицеты, дрожжи и мицелиальные грибы показывают неплохие результаты по накоплению белка на простых целлюлозосодержащих субстратах, однако при использовании в качестве субстрата древесины эти микроорганизмы существенно уступают высшим дереворазрушающим грибам.

Дереворазрушающие грибы делят на возбудители белой гнили, способные глубоко разрушать лигнин, и бурой гнили, разрушающие целлюлозу и другие полисахариды, что обусловлено действием комплекса, включающего до 20 различных ферментов. Однако процессы разрушения древесины в природных условиях идут очень медленно – в течение нескольких лет и более. Считают, что главным фактором, ограничивающим скорость роста грибов, является недостаток азота в древесине. Кроме того, для питания грибов необходимы также сера, фосфор, калий, магний, железо, медь, цинк, марганец, молибден, кальций, галлий, бор, скандий, ванадий. Внесение минеральных веществ в субстрат позволяет значительно сократить сроки выращивания. Так, при поверхностном культивировании мицелия базидиальных грибов *Schizophyllum commune*, *Coriolus pubescens*, *C. hirsutus*, *Pleurotus ostreatus*, *Panus tigrinus* на осиновом опиле с минеральными добавками на протяжении 5–21 сут содержание белка в растительно-грибном концентрате достигало 4–7%. При глубинном культивировании мицелия этих грибов в суспензии опила осины в течение 7–15 сут при pH 5,0–5,5 и температуре 26–28°C содержание белка в растительно-грибном концентрате составило 5–7%.

Для поверхностного способа выращивания используют и крахмалсодержащее сырье − зерно.

Предварительная обработка сырья частично заменяет действие гидролитических ферментов микроорганизмов, и в этом случае выбор продуцента белка облегчается.

5.2.4. Подготовка посевного материала

При выращивании грибов посевным материалом могут служить поверхностные культуры, а также споровый материал или мицелиальная масса продуцента, полученная глубинным культивированием.

Посевную поверхностную культуру получают выращиванием гриба на твердых средах – отрубях, свекловичном жоме, крупах и др. в 3–4 этапа с увеличением объема среды. Культивирование ведут до обильного спорообразования. Посевной материал может храниться при комнатной температуре в течение месяца. Чтобы продлить срок хранения, посевную культуру подсушивают до влажности 10–12% и хранят при температуре 4–6°С. Расход посевной культуры грибов на единицу массы среды составляет при глубинном культивировании около 0,005%, при твердофазном – 0,01%.

Для получения спорового посевного материала конидии отделяют от основной массы поверхностной культуры потоком воздуха в специальном вибросепараторе.

Посевной материал в виде мицелиальной массы получают культивированием грибов в жидкой среде в инокуляторе.

Посевной материал неспороносящих форм микроорганизмов получают ступенчато. Бактерии или дрожжи из пробирки с чистой культурой пересевают несколько раз в последовательно возрастающие объемы питательной среды. Расход посевного материала, получаемого глубинным культивированием, составляет от 3 до 10% к объему засеваемой среды.

Посевного материала должно быть достаточно для обеспечения быстрого развития микроорганизмов, что особенно важно при выращивании микроорганизмов на нестерильных средах.

5.2.5. Выбор способа культивирования

Определяется физиологическими особенностями микроорганизмов и свойствами сырья.

Питательный субстрат из растительного сырья может быть в твердом виде, в виде суспензии или в виде осветленного раствора.

Процессы культивирования микроорганизмов на твердых и суспензионных субстратах можно осуществить несколькими путями:

1) поверхностным или глубинным культивированием микроорганизмов, хорошо растущих на лигноцеллюлозных материалах (прямая биоконверсия);

2) культивированием микроорганизмов после ферментативной обработки растительных отходов или при совместном использовании ферментов и микроорганизмов;

3) выращиванием микроорганизмов на целлюлозо- и гемицеллюлозосодержащих отходах после их предварительной химической обработки (щелочью, кислотой или солями).

Осветленными субстратами в промышленном производстве кормовых дрожжей являются нейтрализованные осветленные сернокислотные гидролизаты растительного сырья и сульфитные щелока.

При выращивании микроорганизмов с целью получения белка на твердых и суспензионных субстратах получают углеводно-белковые продукты (обогащенные белком корма), на осветленном – биомассу микроорганизмов.

Для получения кормовых белковых продуктов используют поверхностный (в основном твердофазный) и глубинный способы культивирования. Поверхностный способ осуществляется в периодическом режиме, глубинный – в периодическом и непрерывном. Твердофазное культивирование применяют почти исключительно для выращивания мицелиальных грибов. Глубинный способ успешно используется для выращивания как дрожжей, так и мицелиальных грибов.

При твердофазном культивировании микроорганизмы выращивают на увлажненных, хорошо аэрируемых твердых (сыпучих) средах. Основой сред является обогащаемый корм: отруби зерновых культур, крупы, лигноцеллюлозные субстраты, свекловичный жом и др. При необходимости в среду в небольших количествах добавляют минеральные элементы, допустимые в составе корма (соли аммония, сульфат магния, сульфат или хлорид калия, фосфаты, сульфат или хлорид кальция, микроэлементы). Влажность среды составляет 55–75%.

Питательные среды стерилизуют, засевают культурами микроорганизмов, перемешивают для равномерного распределения посевного материала, а затем раскладывают в кюветы тонким слоем толщиной 3–5 см. Кюветы помещают в растильные камеры

с регулируемой температурой и влажностью. В современных условиях поверхностное культивирование грибов осуществляют в механизированных установках в слое сыпучей среды толщиной до 300 мм.

По окончании твердофазного процесса получают культуру в виде плотной, подсохшей массы с содержанием сухих веществ 50–65%. До 30% СВ составляют ферменты, неактивные белки, пептиды, аминокислоты, олиго- и полисахариды, нуклеиновые кислоты, минеральные вещества.

Достоинствами твердофазного культивирования являются возможность применения крупнодисперсных субстратов, хорошие физические свойства среды, обеспечивающие высокий уровень тепло- и массообменных процессов в культуре. Микроорганизмы растут в условиях, близких к естественным, при фиксации на субстрате, который при этом быстро и полно используется. Микроскопические грибы при твердофазном культивировании имеют высокую скорость синтеза белка. Мицелий не повреждается механически, как это имеет место в глубинной культуре. Кроме того, готовая культура имеет низкую влажность, что облегчает получение товарной формы.

Глубинное культивирование продуцентов белка обладает следующими преимуществами перед поверхностным: позволяет значительно сократить производственные площади, исключает непроизводительный ручной труд, улучшает гигиену труда, позволяет автоматизировать производство. При глубинном культивировании улучшается степень использования компонентов питательной среды.

Глубинное культивирование проводят в ферментаторах, снабженных перемешивающими устройствами, системами аэрации, термо- и pH-регуляции. Питательные среды стерилизуют непосредственно в ферментаторах или установках непрерывной стерилизации. В технологии биоконверсии растительного сырья часто применяют нестерильные среды. Концентрация питательных компонентов в средах не превышает 25% (обычно 5–10%). В состав питательных сред входят минеральные соли, стимуляторы роста, а также источники органических соединений углерода и азота в водорастворимой или мелкодисперсной форме.

Накопление продуцентами белка связано с накоплением биомассы и при непрерывном культивировании достигает максимума в конце экспоненциальной – начале стационарной фазы роста.

Скорость протока среды поддерживают равной удельной скорости роста микроорганизмов, что обеспечивает требуемую концентрацию биомассы в аппарате. Поступление свежей питательной среды снимает ингибирование роста микроорганизмов продуктами обмена.

Как правило, при непрерывном культивировании удельная скорость роста и биосинтеза целевых продуктов выше, чем при периодическом. Снижается расход компонентов питательной среды, поскольку применяются более бедные среды, повышается коэффициент использования оборудования, уменьшается расход энергии и количество сточных вод.

5.2.6. Режимы культивирования

Выбор оптимального режима культивирования включает определение следующих параметров: состава среды, pH, температуры, уровня аэрации среды, влажности среды и подаваемого воздуха (для твердофазного процесса), вида пеногасителя (для глубинного процесса), продолжительности культивирования.

Уровень pH среды должен соответствовать оптимуму для роста микроорганизмов. Обычно pH устанавливают в интервале 5–7. В условиях глубинного культивирования pH регулируют подачей водного аммиака или растворов слабых кислот (ортофосфорной, уксусной). При твердофазном культивировании, где в ходе роста pH среды не регулируется, солевой состав подбирают так, чтобы обеспечить наименьшие отклонения pH среды от оптимальной величины.

Температура процесса должна быть оптимальной для роста продуцента и накопления им белка. Для дрожжей и грибов она составляет 26–30°C. Термофильные формы микроорганизмов выращивают при температуре до 65°C. При твердофазном культивировании температуру среды поддерживают за счет поступления кондиционированного воздуха, а также подачей воды в рубашку установки. При глубинном культивировании терморегуляцию осуществляют подачей горячей или холодной воды в рубашку ферментатора.

Аэрацию жидких питательных сред производят путем барботажа воздуха и перемешивания жидкости.

При твердофазном культивировании воздух расходуется не только на аэрацию, но и на теплообмен. Влажность подаваемого воздуха должна быть на уровне 98–100%, что необходимо для предотвращения высыхания твердофазной культуры.

Важным элементом технологии глубинного культивирования является ***пеногашение***. Вспенивание среды вызывается наличием таких компонентов, как крахмал, декстрины, белки, пептиды, глюкозиды, пектиновые вещества. Вспенивание приводит к потере культуральной жидкости в результате уноса с газообразной фазой.

Для предотвращения вспенивания применяют природные (соевое, подсолнечное масла, рыбий и свиной жиры) и синтетические (адеканоль, пропинол и др.) пеногасители. Их вносят в культуральную жидкость небольшими порциями, так как передозировка может привести к замедлению и прекращению роста культуры. Для пеногашения могут использоваться также механические устройства.

Продолжительность культивирования продуцентов белка определяется кинетикой роста, накопления белка, потребления компонентов среды. Процесс целесообразно вести до начала стационарной фазы, когда накопление биомассы и белка достигает максимума. Важно контролировать динамику накопления биомассы, поскольку дальнейшее культивирование вызывает перерасход питательных сред и снижение количества белка в корме.

При выращивании микроорганизмов глубинным способом на питательных средах, не содержащих взвешенных частиц, прирост биомассы определяют турбидометрически – по величине оптической плотности культуральной жидкости. В случае применения питательных сред с диспергированными частицами и для твердофазных процессов используют косвенные методы, основанные на определении динамики связанных с ростом показателей (тепловыделение, поглощение кислорода). Активно растущие культуры интенсивно выделяют тепло и поглощают кислород, снижение и последующая стабилизация этих показателей соответствуют переходу в фазу замедления роста и стационарную фазу.

У большинства микроорганизмов при выращивании на средах, содержащих легкоусваиваемые соединения углерода и азота, максимум накопления биомассы и белка достигается в срок не позднее суток. На средах с трудногидролизуемыми субстратами процесс идет в течение 3–10 сут.

5.2.7. Продукты микробной конверсии

К белковым препаратам микробного происхождения предъявляют ряд требований. Так, в их составе ограничивают содержание нуклеиновых кислот, поскольку пуриновые основания в организме

животных трансформируются в мочевую кислоту, что создает риск заболеваний почек и мочевыводящих путей.

Наиболее высоким содержанием нуклеиновых кислот (до 16%) отличается биомасса бактерий. Для дрожжей этот показатель также выше допустимого уровня и составляет до 12%. Суточная норма при кормлении животных равна 2 г нуклеиновых кислот, что соответствует 10–20 г высушенной биомассы бактерий или 20–30 г дрожжей. Для снижения содержания нуклеиновых кислот в клетках микроорганизмы подвергают воздействию высоких температур в течение нескольких секунд, а затем выдерживают несколько часов при 50–55°С, обрабатывают экзогенной рибонуклеазой или кислотами, щелочами, метанолом.

Наименьшее количество нуклеиновых кислот находится в биомассе грибов (в мицелии несовершенных грибов – 5–6%, базидиомицетов – 2–4%). Это обстоятельство наряду с другими характеристиками делает их наиболее привлекательными для получения кормовых продуктов.

Мицелий несовершенных грибов богат белковыми веществами (до 55–57% сырого протеина, 41–43% истинного белка), которые по содержанию незаменимых аминокислот ближе всего к белкам сои. В белке много лизина, основной аминокислоты, недостающей в белке зерновых культур. В состав мицелия базидиомицетов входит 43–49% сырого протеина, 24–30% истинного белка. Белок базидиальных грибов включает все незаменимые аминокислоты, а по количеству серосодержащих аминокислот превосходит бактериальный и дрожжевой.

Грибной белок хорошо усваивается организмом животных. Например, степень усваиваемости белка *Fusarium culmorum* составляет 84%. Усваиваемость азотистых веществ дереворазрушающих грибов может достигать 80–90%. Мицелий грибов содержит также витамины группы В и другие биологически активные соединения. Это позволяет на основе зерна и грибной биомассы составлять сбалансированные кормовые смеси.

Микроорганизмы – продуценты белка не должны вызывать аллергических реакций, обладать патогенными свойствами. Кормовые белковые добавки или обогащенный белком корм не должны содержать токсинов, тяжелых металлов; регламентируется содержание канцерогенов. Для белковых препаратов ограничивают также содержание β-оксимасляной кислоты в липидах, циклопропанов,

разветвленных жирных кислот, жирных кислот с нечетным содержанием атомов углерода (для дрожжевого белка), что регулируется условиями культивирования. По всем перечисленным параметрам анализируют как сам белковый препарат, так и белок биомассы.

5.3. Лабораторная работа. Получение кормового белка на растительных отходах

Вопросы для самоподготовки. 1. Характеристика сырья для производства кормового белка. 2. Методы получения гидролизатов растительных отходов. 3. Превращение основных компонентов растительной ткани в условиях гидролиза. 4. Подготовка гидролизатов к биохимической переработке. 5. Микроорганизмы – продуценты белка на гидролизатах отходов. 6. Режимы культивирования микроорганизмов. 7. Требования к кормовым белковым препаратам.

Цель работы – освоение методов подготовки отходов к выращиванию дрожжей; приобретение практических навыков культивирования продуцентов белка на гидролизатах растительных отходов; сравнительный анализ качества полученной биомассы.

Порядок выполнения работы. Получить посевной материал на агаризованной среде. Приготовить питательные среды. Осуществить выращивание дрожжей в качалочных колбах. Выделить биомассу из культуральной жидкости. Определить концентрацию биомассы дрожжей в культуральной жидкости. Установить содержание редуцирующих веществ в гидролизате и отработанной культуральной жидкости. Рассчитать экономический коэффициент. Определить содержание белка в биомассе дрожжей. Выполнить сравнительный анализ показателей, полученных при использовании различных видов отходов и методов их подготовки, разных культур микроорганизмов – продуцентов белка.

5.3.1. Приготовление посевного материала на агаризованной среде

В качестве продуцентов белка на гидролизном сусле, полученном из растительных отходов, используют дрожжи *Candida*

scottii, *C. tropicalis*, *Hansenula anomala*, *Trichosporon cutaneum*. Применяют один из видов по указанию преподавателя.

Скошенную агаризованную среду в пробирках (сусло-агар) засевают густым штрихом, соблюдая правила асептики, и инкубируют в термостате при температуре 32–34°С в течение 48 ч.

5.3.2. Приготовление питательных сред

5.3.2.1. Получение гидролизатов растительных отходов. Вид отходов для гидролиза устанавливается преподавателем. Влажность отходов определяют весовым методом (см. п. 5.3.2.2).

Навеску отходов массой 50 г измельчают до размеров частиц 3–4 см, смешивают с 300 см^3 1,0–2,5%-ного раствора серной кислоты. Смесь помещают в колбы вместимостью 500–1000 см^3. Гидролиз легкогидролизуемых полисахаридов растительных отходов проводят в автоклаве при температуре 100–140°С в течение 1 ч.

Гидролизат сливают, целлолигнин промывают 200 см^3 горячей (90–95°С) воды, присоединяя промывные воды к гидролизату. Полученный раствор используют для приготовления питательных сред.

5.3.2.2. Установление влажности сырья. Бюкс с крышкой высушивают в сушильном шкафу при температуре 105°С до неизменной массы. В бюкс помещают навеску отходов массой около 1 г и сушат на протяжении 3 ч. После охлаждения бюкса в эксикаторе его взвешивают, снова сушат 1 ч и взвешивают. Так повторяют до достижения неизменной массы. Относительную влажность отходов W, %, рассчитывают по формуле

$$W = \frac{(m_1 - m_2) \cdot 100}{m_1 - m},$$

где m_1 – масса бюкса с навеской до высушивания, г; m_2 – масса бюкса с навеской после высушивания, г; m – масса пустого бюкса, г.

5.3.2.3. Подготовка гидролизата к ферментации. Подготовка гидролизата к ферментации заключается в том, чтобы снизить его кислотность до величины pH, оптимальной для проведения ферментации, и обогатить биогенными элементами (азотом, фосфором, калием).

Нейтрализацию гидролизата осуществляют при температуре 80–85°С в две ступени. Сначала гидролизат нейтрализуют известковым молоком (120–150 г/дм^3 CaO) до pH 3,5 и выдерживают его при температуре нейтрализации, непрерывно перемешивая в течение

30 мин для образования кристаллов гипса. Затем гидролизат донейтрализовывают аммиачной водой до pH 4,2–4,5. После охлаждения нейтрализата образовавшийся осадок отделяют фильтрованием через бумажный фильтр. Измеряют объем фильтрата. Отмеряют 100 см^3 нейтрализата для приготовления питательной среды. Остаток используют для определения концентрации редуцирующих веществ (РВ) эбулиостатическим методом (см. п. 5.3.6).

Выход РВ от абсолютно сухого сырья $Y_{РВ}$, %, рассчитывают по формуле

$$Y_{РВ} = \frac{C \cdot V}{m \cdot (1 - 0{,}01 \cdot W)},$$

где C – концентрация РВ в нейтрализате, %; V – объем нейтрализата, см^3; m – масса навески сырья, г; W – влажность навески, %.

Нейтрализат обогащают биогенными элементами путем внесения сульфата аммония и дигидрофосфата калия. Расчет количества солей производят исходя из требуемого содержания в сусле азота (6% от РВ) и P_2O_5 (3% от РВ). Обогащенный биогенными элементами нейтрализат называют суслом.

Подготовленное гидролизное сусло разбавляют водопроводной водой до содержания РВ 0,4–0,6%. Проверяют и при необходимости корректируют величину pH среды (4,2–4,4). 100 см^3 среды разливают в две качалочные колбы вместимостью 250 см^3 (по 50 см^3). Колбы закрывают колпачками из алюминиевой фольги и стерилизуют в автоклаве на протяжении 15–20 мин при давлении 0,05 МПа.

5.3.3. Выращивание дрожжей в качалочных колбах

Засев качалочных колб производят в условиях асептики. В пробирку с культурой вливают 6–8 см^3 питательной среды из колбы, бактериологической петлей снимают культуру с агаризованной среды и полученную суспензию возвращают в качалочную колбу. Дрожжи выращивают на качалке в течение 6–8 ч при температуре 37–38°С.

5.3.4. Выделение биомассы из культуральной жидкости

Культуральную жидкость из двух колб объединяют, отбирают 10 см^3 для установления концентрации биомассы (см. п. 5.3.5). Из оставшейся культуральной жидкости отделяют биомассу дрожжей центрифугированием на протяжении 15 мин при 5000 мин$^{-1}$.

В фильтрате устанавливают остаточную концентрацию РВ, а дрожжи промывают дистиллированной водой и снова центрифугируют. Биомассу помещают в бюкс, высушивают в сушильном шкафу при температуре 105°С и анализируют на содержание истинного протеина по Барнштейну (см. п. 5.3.8).

5.3.5. Определение концентрации биомассы дрожжей в культуральной жидкости

Мембранный (или бумажный) фильтр средней плотности помещают в бюкс (или чашку Петри без крышки) и высушивают в сушильном шкафу при температуре 105°С в течение 2 ч. Затем бюкс с фильтром охлаждают в эксикаторе и взвешивают с точностью не менее 0,001 г.

10 см^3 суспензии дрожжей фильтруют через подготовленный фильтр. Биомассу дрожжей на фильтре промывают дистиллированной водой для отделения примесей. Фильтр с биомассой помещают в тот же бюкс и высушивают при 105°С до достижения постоянной массы. Расчет концентрации биомассы дрожжей в культуральной жидкости $C_б$, г/дм^3, производят по формуле

$$C_б = \frac{(m_2 - m_1) \cdot 1000}{10},$$

где m_2 – масса бюкса с фильтром и дрожжами, г; m_1 – масса бюкса с фильтром без дрожжей, г; 10 – объем дрожжевой суспензии, см^3.

5.3.6. Определение содержания редуцирующих веществ в гидролизате и отработанной культуральной жидкости

Реактивы, материалы и оборудование: растворы I и II для определения редуцирующих веществ; глюкоза; эбулиостат; бюретка.

5.3.6.1. Приготовление реактивов.

а) раствор I для определения редуцирующих веществ. 10 г $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ и 0,04 г метиленовой сини отвешивают на аналитических весах, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 1 дм^3 с помощью дистиллированной воды, объем раствора доводят до метки и перемешивают;

б) раствор II для определения редуцирующих веществ. 50 г сегнетовой соли (K-Na виннокислый) помещают в стакан и растворяют в 200–300 см^3 дистиллированной воды. В другом стакане

в 100 $см^3$ дистиллированной воды растворяют 4 г желтой кровяной соли. В мерную колбу вместимостью 1 $дм^3$ вливают 150 $см^3$ 50%-ного раствора гидроокиси натрия и раствор сегнетовой соли, перемешивают, добавляют раствор желтой кровяной соли и воду до метки, снова перемешивают.

5.3.6.2. Ход анализа. Эбулиостатический метод основан на восстановлении меди редуцирующим сахаром в щелочной среде при кипячении в присутствии желтой кровяной соли. Образующаяся закись меди не выпадает в осадок, а остается в растворе, давая хорошо растворимое комплексное соединение с желтой кровяной солью. Реакцию проводят в условиях прямого или обратного (в случае очень разбавленных или темных растворов) титрования горячего медно-щелочного раствора раствором редуцирующих веществ в токе водяного пара. Индикатором конца реакции служит метиленовая синь, которая в окислительной среде имеет синюю окраску, а в восстановительной − бесцветна.

Эбулиостат (рис. 5.1) состоит из сосуда *1* (плоскодонная колба), в который через пробку вставлен внутренний сосуд *2*, представляющий собой пробирку, суженную кверху. Внутри сосуда *2* имеется стеклянная трубочка *3*, доходящая почти до дна и соединенная с внутренней полостью сосуда *1* отверстием. В сосуд *1* заливают воду, при закипании которой пар поступает через боковое отверстие в сосуд *2*.

Над эбулиостатом на штативе крепят бюретку, в пробке эбулиостата находится трубочка с резиновым наконечником и зажимом на конце для регулирования давления пара во внешнем сосуде *1*. Сосуд *2* должен слегка касаться воды. Эбулиостат устанавливают таким образом, чтобы кончик бюретки входил в суженное отверстие сосуда *2*.

Нагревают воду до кипения, вынимают внутренний сосуд вместе с пробкой и заливают в него пипетками 5 $см^3$ раствора I и 5 $см^3$ раствора II. Растворы перемешивают и помещают сосуд в колбу. В верхнюю часть эбулиостата вставляют бюретку. Как только жидкость в эбулиостате закипит, начинают приливать по каплям анализируемый гидролизат, предварительно разбавленный в 5–20 раз. Интенсивность кипения жидкости в эбулиостате регулируют при помощи отводной трубки с зажимом. Окраска раствора изменяется от темно-синей через красно-фиолетовую до желтой или желто-зеленой (конец титрования). Если через 1−2 мин окра-

ска раствора не изменится, прибор разбирают, эбулиостат промывают водой и анализ повторяют снова. Необходимо провести не менее трех параллельных анализов.

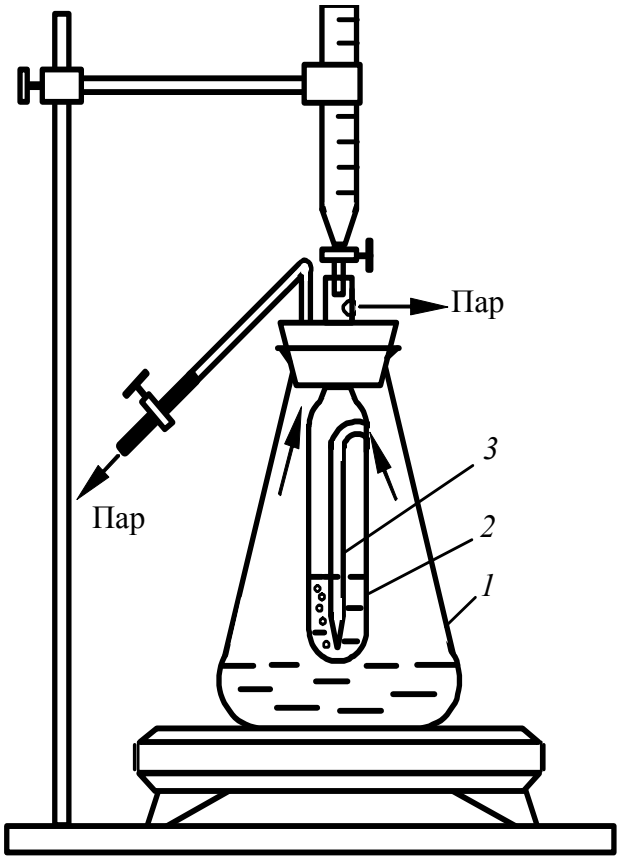


Рис. 5.1. Определение редуцирующих веществ эбулиостатическим методом: *1* – плоскодонная колба; *2* – внутренний сосуд; *3* – трубка

Количество раствора, пошедшего на титрование в разных определениях, не должно отличаться более чем на 0,1–0,2 см^3. Из полученных значений находят среднее и рассчитывают содержание РВ в растворе $C_{РВ}$, %, по формуле

$$C_{РВ} = \frac{n \cdot T \cdot 100}{V \cdot 1000},$$

где n – разбавление; T – титр медно-щелочного раствора по глюкозе (количество глюкозы, которое пошло на восстановление 10 см^3 медно-щелочного раствора при данных условиях титрования), мг; V – объем гидролизата, израсходованного на титрование, см^3.

Титр медно-щелочного раствора по глюкозе устанавливают отдельным титрованием раствором глюкозы с концентрацией 1 мг/ см^3. Титр T, мг, вычисляют по формуле

$$T = c \cdot V_г,$$

где c – концентрация раствора глюкозы, мг/см^3; $V_г$ – объем раствора глюкозы, пошедшего на титрование, см^3.

5.3.7. Расчет экономического коэффициента

Экономический коэффициент $Y_б$, %, характеризующий эффективность конверсии сахаров в биомассу дрожжей, рассчитывают по следующей формуле:

$$Y_б = \frac{C_б \cdot 10 \cdot 100}{C_{исх} - C_{кон}},$$

где $C_{исх}$ – исходная концентрация РВ в питательной среде, %; $C_{кон}$ – конечная концентрация РВ в культуральной жидкости, %.

5.3.8. Определение содержания истинного протеина в биомассе дрожжей по Барнштейну

Реактивы, материалы и оборудование: 10%-ный раствор сульфата меди; 2,5%-ный раствор гидроксида натрия; раствор хлорида бария; сульфат меди; сульфат натрия; концентрированная серная кислота (плотность 1,84 г/см^3); 33%-ный раствор гидроксида натрия; 0,1 н. раствор серной кислоты; смешанный индикатор; 0,1 н. раствор гидроксида натрия; колба Кьельдаля вместимостью 250 см^3; круглодонная колба на 800 см^3; кусочки фарфора (или другие центры кипения); розовая лакмусовая бумажка; холодильник Либиха.

Метод основан на отделении истинного белка от других азотсодержащих веществ путем осаждения его сульфатом меди в щелочной среде. В осадке определяют азот методом Кьельдаля, сущность которого состоит в минерализации осадка концентрированной серной кислотой при нагревании в присутствии сульфата меди в качестве катализатора и сульфата натрия как водоотнимающего средства. Продуктом минерализации является сульфат аммония, который разлагают щелочью и отгоняют аммиак в титрованный раствор серной кислоты:

$$(NH_4)_2SO_4 + 2NaOH \rightarrow Na_2SO_4 + 2NH_3 + 2H_2O.$$

Ход анализа. В химический стакан отвешивают (0,5 ± 0,02) г дрожжей известной влажности с погрешностью не более 0,0002 г и приливают 100 см^3 кипящей дистиллированной воды. Содержимое стакана кипятят в течение 2–3 мин, затем, не охлаждая жидкости, вносят 20 см^3 10%-ного раствора сульфата меди, содержимое перемешивают, добавляют 20 см^3 2,5%-ного раствора гидроксида натрия, снова перемешивают и оставляют стоять при комнатной температуре на протяжении 1 ч. Отстоявшуюся жидкость декантируют через фильтр. Осадок в стакане промывают горячей водой и переносят на фильтр, где вновь промывают горячей водой до исчезновения в промывной воде реакции на сульфат-ион. Проверку производят добавлением в пробу промывной воды 2–3 капель раствора хлорида бария. Отсутствие помутнения указывает на полноту промывки.

Промытый осадок вместе с фильтром подсушивают на воздухе и помещают в колбу Кьельдаля, куда наливают также 20 см^3 концентрированной серной кислоты и добавляют 0,5 г сернокислой меди и 1 г сернокислого натрия. Колбу укрепляют в штативе в наклонном положении над электроплиткой под тягой и включают слабое нагревание. Горло колбы неплотно закрывают стеклянной втулкой или воронкой. В начале минерализации идет бурное выделение газов, жидкость в колбе черная. Постепенно жидкость светлеет, выделение газов уменьшается. В это время усиливают нагрев, опуская колбу на плитку. После обесцвечивания раствора в колбе его нагревают еще 30 мин для полного окисления всех органических веществ пробы, а затем колбу с образовавшимся сплавом солей охлаждают. В охлажденный раствор приливают 200 см^3 дистиллированной воды для растворения сплава солей. Содержимое колбы Кьельдаля с помощью дистиллированной воды количественно переносят в круглодонную колбу вместимостью 800 см^3, добавляют центры кипения и кусочек розовой лакмусовой бумажки. Затем в колбу быстро вливают 100 см^3 33%-ного раствора гидроксида натрия, быстро закрывают колбу пробкой с трубкой, присоединяют к холодильнику (рис. 5.2) и включают нагрев колбы. Лакмусовая бумажка должна стать синей после прибавления щелочи.

Конденсат из холодильника собирают в коническую колбу вместимостью 250–300 см^3, в которую налито 30–50 см^3 точно отмеренного 0,1 н. раствора серной кислоты и добавлено несколько

капель смешанного индикатора (1 объем 0,1%-ного спиртового раствора метиленового голубого и 2 объема 0,1%-ного спиртового раствора метилового красного).

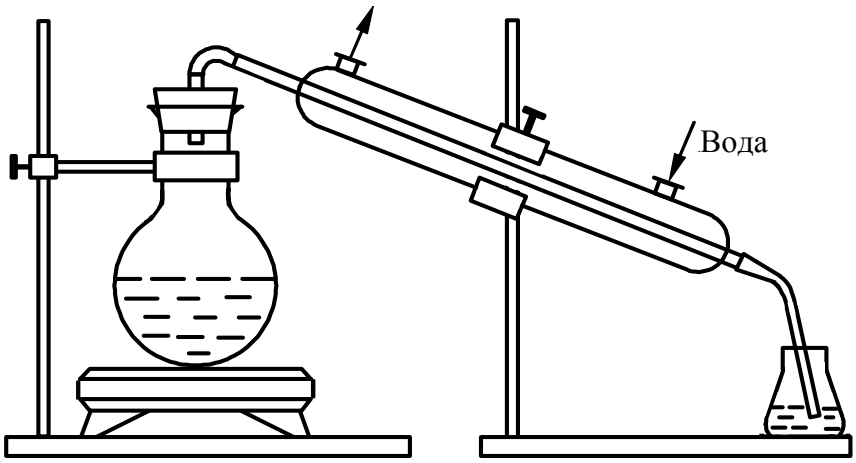


Рис. 5.2. Установка для определения азота

Во время отгонки аммиака нижний конец холодильника должен быть погружен в раствор кислоты в приемнике на глубину 1 см. За несколько минут до окончания отгонки опускают приемник, конец холодильника снаружи обмывают водой из промывалки (вода стекает в приемник) и розовой лакмусовой бумажкой проверяют реакцию последней капли конденсата. Если бумажка останется розовой, то отгон аммиака считают законченным. Серную кислоту, оставшуюся свободной, титруют 0,1 н. раствором гидроксида натрия до обесцвечивания раствора. Одна капля избытка раствора щелочи дает зеленое окрашивание.

Содержание истинного протеина в дрожжах $C_{\text{и.п}}$, %, вычисляют по формуле

$$C_{\text{и.п}} = \frac{(V_1 - V_2) \cdot 0,0014 \cdot 100 \cdot 6,25}{(1 - 0,01 \cdot w) \cdot g},$$

где V_1 – объем 0,1 н. раствора серной кислоты, взятого на анализ, см^3; V_2 – объем 0,1 н. раствора гидроксида натрия, израсходованного на титрование, см^3; 0,0014 – количество азота, эквивалентное 1 см^3 0,1 н. раствора гидроксида натрия (или серной кислоты), мг; 6,25 – эмпирический коэффициент для пересчета азота в белок; w – влажность анализируемых дрожжей, %; g – масса дрожжей, взятых на минерализацию, г.

5.4. Лабораторная работа. Обогащение белком целлюлозосодержащих отходов

Вопросы для самоподготовки. 1. Характеристика отходов сельского хозяйства и деревообработки, перспективных для производства кормовых углеводно-белковых продуктов. 2. Методы подготовки сырья к микробной конверсии. 3. Основные критерии пригодности микроорганизмов в качестве продуцентов белка. 4. Особенности глубинной, поверхностной и твердофазной ферментации мицелиальных грибов. 5. Деструкция целлюлозосодержащих отходов представителями мицелиальных грибов и ассоциациями микроорганизмов.

Цель работы – приобретение практических навыков по выращиванию мицелиальных грибов – продуцентов белка на целлюлозосодержащих отходах; анализ качества полученного углеводно-белкового продукта.

Порядок выполнения работы. Приготовить питательные среды. Получить посевной материал на агаризованной среде и в качалочных колбах. Провести твердофазную ферментацию целлюлозосодержащих отходов. Определить потерю массы субстрата после ферментации. Установить содержание белка в продукте.

5.4.1. Приготовление питательных сред

Минеральная смесь служит источником макро- и микроэлементов и имеет следующий состав, г/дм^3: $(NH_4)_2SO_4$ – 1,0, KH_2PO_4 – 0,6, K_2HPO_4 – 0,4, $MgSO_4$ – 0,05, $ZnSO_4$ – 0,005, $FeSO_4$ – 0,01. Соли растворяют в дистиллированной воде последовательно в указанном порядке. Устанавливают pH раствора 5,4–5,8, стерилизуют автоклавированием при давлении 0,05 МПа в течение 20 мин дважды.

5.4.2. Приготовление посевного материала на агаризованной среде

В качестве продуцентов белка на целлюлозосодержащих отходах используют мицелиальные грибы *Aspergillus niger*, *Coriolus hirsutus*, *Trichoderma viride*, *T. lignorium*, дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida scottii*, *C. utilis*, *C. lipolytica*, *Endomycopsis*

fibuligera, *Trichosporon cutaneum*. Применяют один из видов или ассоциацию микроорганизмов по указанию преподавателя.

Скошенную агаризованную среду в пробирках (сусло-агар) засевают густым штрихом, соблюдая правила асептики, и инкубируют в термостате при температуре 30°С на протяжении 48 ч.

5.4.3. Получение посевного материала в качалочных колбах

В стерильную качалочную колбу вместимостью 250 $см^3$ помещают 20 $см^3$ сусло-бульона. Засев среды в колбе производят в условиях асептики. В пробирку с культурой вливают 6–8 $см^3$ питательной среды из колбы, бактериологической петлей снимают мицелий с агаризованной среды, стараясь разорвать гифы и ресуспендировать их в сусло-бульоне, не затрагивая агаризованную среду. Полученную суспензию возвращают в качалочную колбу. Культуру выращивают на качалке с частотой встряхивания 80–100 $мин^{-1}$ в течение 48 ч при температуре 30°С.

Аналогично получают посевной материал дрожжей – продуцентов белка. Частота встряхивания при выращивании дрожжей составляет 160–180 $мин^{-1}$.

Полученный посевной материал используют для засева среды в чашках Петри.

5.4.4. Твердофазная ферментация целлюлозосодержащих отходов

В две чашки Петри, одну из которых предварительно взвешивают, вносят по 1 г сухих древесных опилок, 2,5 $см^3$ культуральной жидкости продуцента из качалочной колбы (при использовании в качестве продуцента белка мицелиальных грибов) или по 1,25 $см^3$ культуральной жидкости каждого продуцента при применении ассоциации культур, 4,5 $см^3$ минеральной смеси. Содержимое чашек старательно перемешивают стеклянной палочкой до получения однородной массы. Влажность субстрата при этом будет составлять около 75%.

Содержимое чашки № 1 используют для установления исходного содержания белка одним из методов по указанию преподавателя (см. п. 5.4.6, 5.4.7).

Предварительно взвешенную чашку № 2 взвешивают снова с засеянным субстратом и по разности с массой пустой чашки рассчитывают массу субстрата до ферментации.

Посев в чашке № 2 культивируют на протяжении 7 сут при температуре 30°С. В полученном продукте устанавливают содержание белка и потерю массы субстрата после ферментации (см. п. 5.4.5).

5.4.5. Установление потери массы субстрата после ферментации

В процессе культивирования часть массы утилизированного субстрата переходит в биомассу продуцента. Другая часть субстрата расходуется на неконструктивный метаболизм – процессы дыхания и иную жизнедеятельность клеток. Потеря массы субстрата – величина, которая свидетельствует об интенсивности метаболических процессов продуцента: чем она больше, тем более высокий уровень метаболической активности проявляет продуцент.

Установление потери массы субстрата проводят на 7 сут ферментации. Для этого взвешивают чашку № 2 с углеводно-белковым продуктом и по разности с массой пустой чашки рассчитывают массу субстрата после ферментации. Потерю массы X, %, вычисляют по формуле

$$X = \frac{(m_1 - m_2) \cdot 100}{m_1 - m},$$

где m_1 – масса склянки с субстратом до ферментации, г; m_2 – масса склянки с субстратом после ферментации, г; m – масса пустой склянки, г.

5.4.6. Определение содержания белка по методу Брэдфорда

Реактивы, материалы и оборудование: оксид алюминия (или кварцевый песок); 0,15 М раствор NaCl; яичный альбумин (овальбумин); реактив Брэдфорда; центрифуга; спектрофотометр.

Сущность метода состоит в специфическом связывании красителя кумасси бриллиантового голубого G-250 с белком, при этом максимум поглощения красителя смещается в длинноволновую область спектра.

5.4.6.1. Приготовление реактивов. Реактив Брэдфорда. Растворяют 100 мг кумасси бриллиантового голубого G-250 в 50 см^3 95%-ного этанола. К раствору добавляют 100 см^3 85%-ной фосфорной кислоты и доводят до 1 дм^3 дистиллированной водой. Фильтруют. Хранят при 20°С в течение 2 недель.

5.4.6.2. Ход анализа. Для извлечения белка из биомассы продуцента навеску массой 1 г растирают в ступке с 300 мг оксида алюминия или кварцевого песка. Пасту количественно переносят в коническую колбу вместимостью 100 см^3, заливают 50 см^3 0,15 М раствора NaCl и экстрагируют при перемешивании на протяжении 30 мин при комнатной температуре. Осадок отделяют центрифугированием в течение 10 мин при 5000 мин$^{-1}$. Супернатант декантируют, измеряют его объем и определяют содержание в нем белка по методу Брэдфорда. Для этого 1 см^3 супернатанта разбавляют в 50–100 раз 0,15 М раствором NaCl и к 0,05 см^3 разбавленного раствора белка приливают 2,5 см^3 раствора красителя, тщательно перемешивают и измеряют величину экстинкции при 595 нм против холостой пробы (0,05 см^3 0,15 М раствора NaCl + 2,5 см^3 раствора красителя).

Для установления концентрации белка в растворе необходимо построить калибровочный график. Для этого готовят раствор яичного альбумина с концентрацией 200 мкг/см^3 (10 мг белка растворяют в 50 см^3 0,15 М раствора NaCl), затем производят разбавление исходного раствора согласно табл. 5.1.

Таблица 5.1

Данные для построения калибровочного графика

Номер пробирки	Концентрация белка, мкг/см^3	Объем раствора белка-стандарта, см^3	Объем 0,15 М раствора NaCl, см^3	D_{595}
1	10	0,5	9,50	
2	20	0,5	4,50	
3	30	0,5	2,80	
4	40	0,5	2,00	
5	50	1,0	3,00	
6	60	1,0	2,30	
7	70	1,0	1,85	
8	80	1,0	1,50	
9	90	1,0	1,20	
10	100	1,0	1,00	

Отбирают по 0,5 см^3 каждого разбавления, добавляют 2,5 см^3 раствора красителя и измеряют величину экстинкции так, как и для рабочего раствора. Затем по построенному калибровочному графику зависимости D_{595} от концентрации белка определяют концентрацию белка в растворе (мг/см^3) и рассчитывают содержание белка X, %, в сухой массе углеводно-белкового продукта по формуле

$$X = \frac{a \cdot V \cdot n \cdot 100}{g \cdot (1 - 0{,}01 \cdot w) \cdot 1000},$$

где a – концентрация белка в растворе, мг/см^3; V – объем раствора, см^3; n – разбавление исходного раствора белка; g – навеска углеводно-белкового продукта, г; w – влажность углеводно-белкового продукта, %.

5.4.7. Определение содержания белка по методу Варбурга и Христиана

Реактивы, материалы и оборудование: оксид алюминия (или кварцевый песок); 0,3%-ный раствор Na_2CO_3 в 0,6 М растворе NaCl; центрифуга; спектрофотометр.

Суть метода заключается в измерении оптической плотности белкового экстракта при 280 и 260 нм. Большинство белков имеет максимум поглощения при 280 нм, что обусловлено содержанием в них остатков триптофана и тирозина. Нуклеиновые кислоты, присутствующие часто в виде примесей к белкам, также обладают сильным поглощением при 280 нм, но максимум поглощения этих соединений находится при 260 нм. Экспериментально установлены коэффициенты экстинкции различных белков и нуклеиновых кислот при 260 и 280 нм и найдено соотношение этих коэффициентов, т. е. фактор F (табл. 5.2).

Таблица 5.2

Соотношение коэффициентов экстинкции

$A_{280/260}$	Нуклеиновая кислота, %	F
1,750	0,0	1,116
1,520	0,5	1,054
1,360	1,0	0,994
1,160	2,0	0,899
1,030	3,0	0,814
0,939	4,0	0,743
0,874	5,0	0,682
0,822	6,0	0,632
0,784	7,0	0,585
0,753	8,0	0,545
0,730	9,0	0,508
0,705	10,0	0,476
0,645	14,0	0,377
0,595	20,0	0,270

Ход анализа. Для извлечения белка из биомассы продуцента навеску влажного углеводно-белкового продукта (2−3 г) растирают в чашке с 1 г оксида алюминия или кварцевого песка. Пасту количественно переносят в коническую колбу вместимостью 100 см^3, заливают 50 см^3 0,3%-ного раствора Na_2CO_3 в 0,6 М растворе NaCl и перемешивают на магнитной мешалке 30 мин при комнатной температуре. Суспензию центрифугируют при 5000 мин$^{-1}$ в течение 10 мин. Осадок отбрасывают, а супернатант используют для установления концентрации белка. Измеряют оптическую плотность раствора белка при длинах волн 260 и 280 нм. Вычисляют соотношение полученных величин, по табл. 5.2 находят соответствующее значение F и рассчитывают содержание белка в углеводно-белковом продукте X, %, по формуле

$$X = \frac{F}{I \cdot D_{280}} \cdot \frac{50 \cdot 100}{g},$$

где $\frac{F}{I \cdot D_{280}}$ – концентрация белка в экстракте, мг/см^3; 50 – общий объем экстракта, см^3; g – навеска углеводно-белкового продукта, мг.

5.4.8. Расчет продуктивности культуры

Прирост биомассы Y, %, определяют по формуле

$$Y = \frac{(X_2 - X_1) \cdot 100}{X_1},$$

где X_2, X_1 – содержание белка в углеводно-белковом продукте и засеянном субстрате до ферментации соответственно, %.

6 ОЦЕНКА ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ ОПАСНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ПЕСТИЦИДОВ

6.1. Характеристика и классификация пестицидов. Почвенно-микробиологическая оценка результатов применения пестицидов

6.1.1. Характеристика и классификация пестицидов

Пестициды – термин для обозначения широкого круга веществ и препаратов (в том числе на основе микроорганизмов и продуктов их жизнедеятельности), используемых для борьбы с вредителями и болезнями растений, сорными растениями, вредителями хранящейся сельскохозяйственной продукции, а также для регулирования роста растений, предуборочного удаления листьев и предуборочного подсушивания растений.

По данным ФАО (Международной продовольственной организации), если не применять химическую защиту растений, уже в первый год население планеты потеряет половину всего продовольствия. Однако использование синтетических пестицидов таит в себе опасность загрязнения окружающей среды и ухудшения продуктов питания по параметрам безопасности.

Потребность в применении веществ, отпугивающих или убивающих вредителей и возбудителей болезней растений, возникла вместе с зарождением сельского хозяйства. Синтетические пестициды начали широко использовать с 1939 г., когда швейцарский химик Пауль Герман Мюллер открыл инсектицидные свойства ДДТ (дихлордифенилтрихлорэтана). С помощью этого хлорорганического соединения уничтожали насекомых – переносчиков малярии, тифа, других опасных болезней. На обработанных местах вредные насекомые не появлялись длительное время.

Негативное воздействие хлорорганических пестицидов на окружающую среду проявилось спустя несколько десятилетий их применения. Эти средства оказались очень устойчивыми, в окружающей среде они не разлагаются десятилетиями, плохо растворимы в воде. В то же время они надолго задерживаются в жировых тканях животных и человека, вызывая серьезные заболевания и даже гибель. Кроме того, у вредителей через несколько лет вырабатывается устойчивость к применяемому препарату. Сейчас в большинстве стран мира производство и использование хлорорганических пестицидов запрещено.

Пестицидами нового поколения являются вещества, полученные из природного материала, так называемые биопестициды. Эти вещества эффективны в небольших количествах, менее токсичны для человека, быстро разлагаются в природных условиях, не вызывают привыкания у вредителей. Выделяют три группы биопестицидов:

– препараты на основе микроорганизмов (бактерий, грибов, вирусов и простейших) и продуктов их жизнедеятельности. Более чем 50% в этой группе составляют препараты на основе бактерии *Bacillus thuringiensis*;

– препараты из растений, экстракты из различных природных субстратов. Их пестицидное действие обусловлено наличием в них специфических биологически активных веществ;

– феромоны – препараты на основе природных соединений, не оказывающих токсического действия на вредные организмы, а влияющих только на их поведение. Обычно используются в виде приманок и ловушек для вредных насекомых.

В настоящее время в мире применяется более 100 тысяч пестицидов на основе около 1000 химических соединений. Для систематизации и удобства использования эти вещества классифицируют, причем классификации основаны на разных критериях. Существуют классификации пестицидов по происхождению (биологическое или химическое), по объектам применения (табл. 6.1), по способу проникновения в организм вредителя и характеру действия (табл. 6.2), по химическому составу действующего вещества, по форме выпуска. Следует отметить, что такое деление в некоторой степени условно, так как многие пестициды по объектам применения имеют универсальное действие, значительное количество пестицидов проявляет одновре-

менно кишечное, контактное и фумигационное действие. В таких случаях их относят к той группе, где вещество проявляет наибольшую активность.

Таблица 6.1

Классификация пестицидов по объектам применения

Группа пестицидов	Объект действия	Группа пестицидов	Объект действия
Авициды	Уничтожение птиц-вредителей	Ихтиоциды	Уничтожение рыб
Акарициды	Уничтожение клещей	Ларвициды	Уничтожение личинок, гусениц насекомых
Альгициды	Уничтожение водорослей	Лимациды	Уничтожение моллюсков, слизней
Бактерициды	Уничтожение бактерий	Нематоциды	Уничтожение нематод
Вироциды	Уничтожение вирусов	Овициды	Уничтожение яиц насекомых
Гербициды	Уничтожение сорных растений	Фунгициды	Уничтожение грибов
Десиканты	Ускорение созревания	Регуляторы роста	Стимуляция или угнетение роста растений
Ретарданты	Замедление роста в высоту	Феромоны-аттрактанты	Привлечение насекомых
Зооциды, родентициды	Уничтожение грызунов	Феромоны-реппеленты	Отпугивание насекомых
Инсектициды	Уничтожение насекомых	Хемостерил-лянты	Стерилизация животных

Таблица 6.2

Классификация пестицидов по способу проникновения в организм вредителя, по характеру действия

Группа пестицидов	Способ проникновения, механизм действия
Контактные	Убивают вредителя при контакте с любой его частью
Кишечные	Вызывают отравление вредителя при попадании в кишечник
Системные	Проникают в растение через наземные органы или корни. Находятся в клеточном соке, отравляют вредителей, питающихся растением, или уничтожают само растение
Фумиганты	Находясь в газообразном состоянии, попадают в организм вредителя через органы дыхания

По химическому составу действующего вещества пестициды делятся на три основные группы:

1) неорганические соединения (соединения меди, серы, фтора, ртути и др.);

2) пестициды растительного, бактериального и грибного происхождения (пиретрины, антибиотики, фитонциды, бактериальные и грибные препараты);

3) органические соединения – большая группа искусственно синтезированных пестицидов (пиретроиды) с высокой биологической активностью.

В зависимости от химического строения пестициды относят к определенному химическому классу: сера и ее препараты; медьсодержащие соединения и другие неорганические металлсодержащие соединения; циановые и родановые соединения; производные сульфокислот; фторсодержащие соединения; синтетические пиретроиды; органические металлсодержащие соединения; углеводороды и их производные; альдегиды и их производные; кетоны и их производные; карбоновые кислоты и их производные; производные карбаминовой, тио- и дитиокарбаминовой кислот; галоидозамещенные анилиды карбоновых кислот; производные мочевины, гуанидина и других аминосоединений; производные урацила; гетероциклические соединения; нитро- и галоидопроизводные фенола; фосфорорганические соединения; хлорорганические соединения; ртутьорганические соединения.

Выпускают пестициды в виде порошков (дустов) для опыления и окуривания; гранулированных препаратов для обработки растений и внесения в почву; растворов в воде и в органических растворителях (в том числе растворов для ультрамалообъемного опрыскивания, применяемых для обработки растений); смачивающихся порошков, используемых в виде водной суспензии для опрыскивания; концентратов эмульсий, которые при разбавлении водой образуют эмульсии для опрыскивания; паст и водных суспензий; аэрозолей и фумигантов; а также в виде других форм – антисептического и инсектицидного мыла, красок, лаков, мазей, мастик, восков, инсектицидных карандашей, инсектицидной и бактерицидной бумаги, различных приманок.

Эффективность пестицидов зависит от правильного выбора типа препарата и его дозы, от климатических и грунтовых условий (действие гербицидов усиливается на плодородных и хорошо увлажненных

грунтах, а на сухих и бедных грунтах снижается), от правильного выбора сроков обработки. Обработку производят в профилактических целях для предотвращения заражения либо при первых же признаках заражения утром или вечером в безветренную погоду. Максимальный эффект действия гербицидов наблюдается при температуре 16–22°С.

Существуют разнообразные способы применения пестицидов:

– опрыскивание обеспечивает равномерное распределение биоцида при малых затратах препарата. Возможно использование комбинированных препаратов. При этом способе применения за пределы обрабатываемого участка попадает наименьшее количество препарата;

– опыление является простым и высокопродуктивным способом, но расход препарата больший, чем при опрыскивании. Недостатком является то, что за пределы обрабатываемого участка может разноситься ветром 50–90% препарата;

– предпосевная обработка – протравливание семян;

– внесение в грунт или на его поверхность жидких, гранулированных или порошкообразных препаратов;

– использование отравленных приманок;

– фумигация – специальный способ химической обработки газообразными веществами помещений, грузов, продуктов.

Систематическое использование стойких высокотоксичных пестицидов, особенно в чрезмерном количестве, отрицательно влияет на экосистемы и здоровье человека. Пестициды угнетают биологическую активность грунтов, уничтожают полезные микроорганизмы, червей, уменьшают естественную плодородность. Загрязнение окружающей среды ядохимикатами приводит к уничтожению полезных насекомых (в том числе насекомых-опылителей), птиц, рыбы, животных, отравлению людей непосредственно пестицидами или продуктами, в которых они накапливаются. Все пестициды относятся к ядам широкого спектра действия; попадая в организм человека и теплокровных животных даже в очень малом количестве, они способны стать причиной нарушения деятельности центральной нервной системы и жизненно важных органов. Пестициды вызывают аллергии, появление доброкачественных и злокачественных опухолей, хромосомных аномалий, которые могут проявиться даже через несколько поколений, нарушают развитие плода во время беременности. Ежегодно в мире около миллиона человек подвергается отравлению пестицидами.

6.1.2. Почвенно-микробиологическая оценка результатов применения пестицидов

Пестициды используются главным образом в земледелии. При этом основная масса различных пестицидов попадает в почву, оказывая на почвенные микроорганизмы как непосредственное, так и опосредованное действие.

Прямое действие обусловлено токсичностью пестицидов и носит избирательный характер. Опосредованное влияние связано с изменением технологии возделывания сельскохозяйственных культур при использовании пестицидов (минимальные обработки, сужение севооборотов и др.), что влечет за собой изменение водно-воздушного режима почвы и характера перераспределения в ней растительных остатков, а также с воздействием пестицидов на функциональное состояние растений.

Важнейшей составляющей в оценке экологической опасности применения пестицидов является почвенно-микробиологическая оценка, что обусловлено ролью микроорганизмов в плодородии почвы и самоочищении ее от патогенов и чужеродных веществ.

Почвенно-микробиологическую оценку последствий использования пестицидов осуществляют в два этапа. На первом этапе исследования проводят в лабораторных условиях, на втором этапе выполняются полевые исследования.

Основная задача лабораторных исследований – выяснить токсические нагрузки пестицидов (по изменению численности микроорганизмов или ингибированию биохимических процессов), выявить наиболее чувствительные показатели и на основании полученных данных оценить возможные последствия применения пестицидов для почвенно-микробиологических процессов. Этот этап исследований играет роль почвенно-микробиологического скрининга пестицидов.

На втором этапе дается почвенно-микробиологическая оценка предлагаемых агротехнических мероприятий в целом, где пестициды являются лишь одним элементом агротехники, определяющим характер и интенсивность проходящих в почве микробиологических процессов. В данном случае речь идет о мониторинге последствий длительного систематического использования пестицидов для почвенной микробиоты.

Выяснение первопричин, вызывающих изменения микробиоты почвы, имеет существенное значение для почвенно-микробиологического обоснования агротехнических мероприятий. Например, причина отрицательного действия минимальных обработок на микробиоту суглинистых почв в условиях достаточного увлажнения заключается не в токсичности широко распространенного гербицида 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д), а в изменении водно-воздушного режима почвы. Поэтому с практической точки зрения отрицательную оценку должен получить не гербицид, а технология механической обработки таких почв.

В основу оценки токсичности пестицидов для почвенных микроорганизмов положен принцип пороговости, согласно которому степень воздействия химических веществ на организм зависит от концентрации этих веществ в среде, дозы и времени контакта. Существует такая концентрация (порог), ниже которой действие данного вещества практически прекращается.

Первичное воздействие пестицидов на отдельно взятый организм обусловлено химической структурой соединения и сосредоточено на каком-то жизненно важном физиологическом показателе, который принято называть «мишенью». Так, основной «мишенью» для производных фенилмочевины является фотосинтетический аппарат, для фосфорорганических инсектицидов – ацетилхолинэстераза.

Положения, сформулированные гигиенистами и токсикологами для оценки токсического действия химических и физических агентов на отдельно взятый организм, в принципе верны и для экосистемы. Она представляется как единое целое и характеризуется определенной структурной организацией (биоценоз), потоком энергии и круговоротом веществ.

Микробиота почвы является частью наземной экосистемы, поэтому для первичной оценки важно определить те нагрузки, или те концентрации пестицидов, при которых происходит существенное изменение основных параметров экосистемы. Это определяет выбор показателей (индикаторов) для почвенно-микробиологической оценки токсичности пестицидов. Наиболее часто в качестве таких показателей используют: дыхание почвы (по выделению CO_2), нитрификацию, азотфиксацию, минерализацию

органофосфатов, разложение целлюлозы, микробиологический анализ (учет сапрофитных бактерий, актиномицетов, грибов, микроскопических водорослей, микрофауны), анализ симбиотических систем (бобово-ризобиальный симбиоз, микориза, лишайники).

В качестве критерия токсического действия пестицидов на микробиоту почвы приняты такие концентрации, которые снижают численность микроорганизмов или ингибируют соответствующие биохимические процессы на 50% (соответственно $СК_{50}$ и $ИК_{50}$). Для определения этих концентраций проводят лабораторные исследования, используя концентрации пестицидов, возрастающие в геометрической прогрессии.

Максимальные концентрации пестицидов в почве заранее заданы и обусловлены производственной необходимостью и санитарно-гигиеническими нормами. Поэтому оценка экологической опасности пестицидов дается в сравнении с производственными концентрациями (ПК) и выражается отношением, которое условно можно рассматривать как коэффициент безопасности или надежности ($K_б$):

$$K_б = \frac{ПК}{ИК_{50}}.$$

Характеристика $ИК_{50}$ и $K_б$ по каждому из показателей позволяет вычленить наиболее чувствительные из них и определить таким образом «экологические мишени». О «вредности» пестицида для «мишени» судят по следующей шкале:

$K_б < 1$ – сильный ингибитор;

$1 < K_б < 10$ – умеренный ингибитор;

$10 < K_б < 100$ – слабый ингибитор;

$K_б > 100$ – практически не токсичен.

Лабораторная оценка является предварительной и не заменяет полевые исследования, однако позволяет судить о механизме действия пестицидов на ассоциацию почвенных микроорганизмов, вычленяя наиболее чувствительные звенья. Она может быть использована для скрининга особо токсичных веществ и предваряет выбор основных показателей для полевых исследований. Это дает значительную экономию времени и материальных средств при анализе экологических последствий применения пестицидов в земледелии.

6.2. Лабораторная работа. Оценка экологической опасности применения пестицидов

Вопросы для самоподготовки. 1. Проблемы использования химических пестицидов, преимущества биопестицидов. 2. Классификация пестицидов по происхождению, по объектам применения, по способу проникновения в организм вредителя и характеру действия, по химическому составу действующего вещества, по форме выпуска. 3. Способы применения пестицидов и влияние их на экосистемы и здоровье человека. 4. Значение лабораторного этапа в почвенно-микробиологической оценке опасности использования пестицидов. 5. Показатели и критерии токсического действия пестицидов на микробиоту почвы.

Цель работы – освоение методов почвенно-микробиологической оценки результатов применения пестицидов; установление критерия токсического воздействия пестицидов на протекающие в почве биохимические процессы.

Порядок выполнения работы. Подготовить почву, определить ее влажность и влагоемкость, увлажнить и обработать почву разными дозами пестицидов. Установить показатели биохимической активности почвы, подвергавшейся воздействию пестицидов: интенсивность дыхания, скорость разложения целлюлозы, активность почвы в процессах фиксации азота. Определить интенсивность нитрификации при воздействии пестицидов. Провести анализ результатов применения пестицидов.

6.2.1. Подготовка почвы к проведению почвенно-микробиологической оценки результатов применения пестицидов

Материалы и оборудование: почва; пестициды; аналитические весы; сито с диаметром отверстий 3 мм; стеклянные (пластмассовые) кюветы; сосуды емкостью 0,5–1,0 дм^3.

Ход анализа. Для лабораторных опытов отбирают образцы почвы из пахотного горизонта на глубине 0–20 см. Влажную почву подсушивают до воздушно-сухого состояния, просеивают через сито (диаметр отверстий 3 мм) и хранят в ящиках.

Перед использованием определяют влажность и влагоемкость (см. п. 6.2.2) почвы и увлажняют ее до 60% от полной влагоемкости.

Параллельно готовят две навески почвы по 100 г. Навеску почвы насыпают тонким слоем в стеклянную или пластмассовую кювету. В первую навеску осторожно вносят рассчитанное количество воды и пестицида, во вторую – только воду (контроль).

Концентрацию пестицидов рассчитывают на массу почвы, количество вносимого в почву пестицида должно укладываться в интервале 1–100-кратной производственной концентрации данного пестицида. Для оценки токсичности большинства пестицидов, производственные дозы которых не превышают 10 кг/га, рекомендуется использовать ряд концентраций, возрастающих в геометрической прогрессии: 1, 5, 25, 125, 625 мг/кг.

Пестициды по указанию преподавателя вносят в почву в виде водных растворов, эмульсий или тонкодисперсных суспензий. Гранулированные препараты равномерно рассеивают на поверхности увлажненной почвы.

Почву тщательно перемешивают и переносят в сосуды емкостью 0,5–1,0 дм^3, высота слоя почвы должна составлять 5–7 см. Сосуды закрывают тонкой полиэтиленовой пленкой и помещают в термостат с температурой 26–27°С на 30 сут.

6.2.2. Определение влажности и полной влагоемкости почвы

Материалы и оборудование: фильтровальная бумага; бюксы; эксикатор; сушильный шкаф; металлический цилиндр с сеткой (стеклянная трубка); аналитические весы.

Ход анализа. Бюкс с крышкой высушивают в сушильном шкафу при температуре 105°С до постоянной массы. В бюкс помещают навеску почвы массой около 1 г и сушат при тех же условиях в течение 3 ч. После охлаждения бюкса в эксикаторе его взвешивают, снова сушат на протяжении 1 ч и взвешивают. Так повторяют до неизменной массы.

Расчет влажности почвы. Влажность на 100 г абсолютно сухой почвы W, %, определяют по формуле

$$W = \frac{m_{\text{вл.п}} - m_{\text{с.п}}}{m_{\text{с.п}}} \cdot 100, \qquad (6.1)$$

где $m_{\text{вл.п}}$ – масса влажной почвы, г; $m_{\text{с.п}}$ – масса сухой почвы, г.

Для установления полной влагоемкости почвы используют металлический цилиндр диаметром 4 см и высотой 20 см, в один конец которого впаяна металлическая сетка. На сетку внутри ци-

линдра помещают 1–2 слоя увлажненной фильтровальной бумаги. Металлический цилиндр можно заменить стеклянной трубкой, один конец которой обвязывают 2–3 слоями марли, между которыми делают прокладки из фильтровальной бумаги.

Навеску почвы (100 или 50 г) помещают в цилиндр, закрывают крышкой, взвешивают и опускают в сосуд с водой. Уровень воды в сосуде должен соответствовать уровню почвы в цилиндре. Через сутки цилиндр вынимают из воды, позволив стечь излишку воды, и взвешивают. Полная влагоемкость почвы состоит из влаги, которая имелась в почве, и поглощенной влаги.

Расчет полной влагоемкости. Полная влагоемкость на 100 г абсолютно сухой почвы $W_{\text{полн}}$, %, представляет сумму имевшейся в почве и поглощенной влаги:

$$W_{\text{полн}} = \frac{m_{\text{вл}} + m_{\text{п.вл}}}{m_{\text{с.п}}} \cdot 100, \qquad (6.2)$$

где $m_{\text{вл}}$ – масса имевшейся в почве влаги, г; $m_{\text{п.вл}}$ – масса поглощенной влаги, г; $m_{\text{с.п}}$ – масса сухой почвы, г.

Масса имевшейся в почве влаги, выраженная из формулы (6.1), равна:

$$m_{\text{вл}} = \frac{m_{\text{с.п}} \cdot W}{100}. \qquad (6.3)$$

Подставив (6.3) в (6.2), получаем формулу для расчета полной влагоемкости:

$$W_{\text{полн}} = W + \frac{m_{\text{п.вл}}}{m_{\text{с.п}}} \cdot 100.$$

Расчет количества воды для увлажнения почвы. Влажность почвы должна составлять 60% от полной влагоемкости: $W_1 = 0{,}6 \cdot W_{\text{полн}}$. Количество воды $m_{\text{воды}}$, г, которое необходимо внести в навеску почвы, рассчитывают по формуле

$$m_{\text{воды}} = \frac{m_{\text{с.п}} \cdot (0{,}6 \cdot W_{\text{полн}} - W)}{100}.$$

6.2.3. Установление показателей биохимической активности почвы, подвергавшейся воздействию пестицидов

Через 30 сут инкубирования проводят анализ показателей биохимической активности почвы, обработанной пестицидами, и инкубированной без пестицидов (контроль).

6.2.3.1. Установление интенсивности дыхания почвы по выделению CO_2.

Реактивы и оборудование: термостат; бюретка; колбы Эрленмейера емкостью 250 см^3; 0,1 н. раствор NaOH; 50%-ный раствор $BaCl_2$; 0,1 н. раствор HCl; 0,1%-ный спиртовой раствор фенолфталеина.

Ход анализа. Навеску почвы массой 25 г (в пересчете на абсолютно сухое вещество) помещают в мешочек из капроновой сетки, который подвешивают на крючок, вставленный в резиновую пробку. Этой пробкой закрывают колбу Эрленмейера емкостью 250 см^3, в которую налито 200 см^3 0,1 н. раствора NaOH. Колбу помещают в термостат с температурой 26–27°С на 3 сут. Аналогичный опыт ставят без почвы (холостой опыт).

По окончании инкубации пробку с мешочком удаляют из колбы, в раствор NaOH добавляют 2 мг 50%-ного раствора $BaCl_2$, 2–3 капли 0,1%-ного спиртового раствора фенолфталеина и титруют 0,1 н. раствором HCl.

Количество CO_2 C, мг/(г · сут), выделившееся в процессе дыхания почвы и поглощенное раствором NaOH, вычисляют по формуле

$$C = \frac{[(V_1 - V_2) - (V_1 - V_3)] \cdot 2,2}{m \cdot t},$$

где V_1 – объем 0,1 н. раствора HCl, пошедший на титрование исходного 0,1 н. раствора NaOH, см^3; V_2 – объем 0,1 н. раствора HCl, израсходованный на титрование 0,1 н. раствора NaOH после инкубации почвы, см^3; V_3 – объем 0,1 н. раствора HCl, пошедший на титрование 0,1 н. раствора NaOH после инкубации в холостом опыте, см^3; 2,2 – количество CO_2, эквивалентное 1 см^3 0,1 н. HCl, мг/см^3; m – масса почвы, г; t – время инкубации, сут.

6.2.3.2. Установление скорости разложения целлюлозы.

Оборудование: термостат; чашки Петри; аналитические весы.

Ход анализа. Модифицированным методом Кристенсена определяют скорость разложения целлюлозы в исходной почве и в почве, прошедшей обработку пестицидами.

На дно стерильной чашки Петри помещают стерильный диск фильтровальной бумаги известной массы диаметром 8 см. Фильтр покрывают сеткой из капроновой ткани, на которую помещают 25 г почвы, увлажненной до 60% от полной влагоемкости. Чашку ставят в термостат с температурой 26–27°С на 30 сут. В процессе ин-

кубирования почвы следят за развитием целлюлозоразрушающих микроорганизмов на фильтровальной бумаге со стороны дна чашки и контролируют влажность почвы, не допуская ее пересыхания.

Через 30 сут почву высыпают из чашки, осторожно отделяют капроновую ткань, собирают остатки фильтровальной бумаги, подсушивают до воздушно-сухого состояния и взвешивают. Степень разложения целлюлозы X, %, рассчитывают по формуле

$$X = \frac{m_{\text{исх}} - m_{\text{кон}}}{m_{\text{исх}}} \cdot 100,$$

где $m_{\text{исх}}$ – начальная масса фильтра, г; $m_{\text{кон}}$ – масса фильтра после инкубации с почвой, г.

6.2.4. Установление интенсивности нитрификации в почве, подвергавшейся воздействию пестицидов

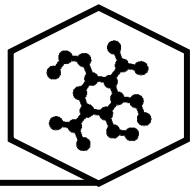
Активность минерализации и трансформации азотсодержащих органических соединений определяют по нитрификационной способности почвы. При внесении в почву богатого белком растительного материала микроорганизмы осуществляют трансформацию белка и аминокислот по схеме: $R - NH_2 \rightarrow NH_4^+ \rightarrow NO_2^- \rightarrow NO_3^-$. Независимо от того, на каком этапе трансформации соединений азота пестициды будут ингибировать процесс, это отразится на накоплении нитратов в почве.

Реактивы, материалы и оборудование: дисульфофеноловая кислота; 15%-ный раствор NaOH; KNO_3; люпиновая мука; термостат; электрофотоколориметр; сосуд емкостью 0,5–1,0 дм^3; колбы Эрленмейера емкостью 250 см^3; фарфоровые чашки; водяная баня; мерная колба на 100 см^3; мерная колба на 1 дм^3.

Проведение нитрификации. 50 г почвы увлажняют до 60% от полной влагоемкости (см. п. 6.2.2), вносят указанную преподавателем дозу пестицида (контрольный образец – без внесения пестицида), добавляют 300 г люпиновой муки и тщательно перемешивают. От полученного образца отбирают пробу (50 г) для определения исходного содержания нитратов. Оставшуюся часть образца переносят в сосуд емкостью 0,5–1,0 дм^3 так, чтобы высота слоя почвы составляла 5–7 см. Сосуд закрывают тонкой полиэтиленовой пленкой и помещают в термостат с температурой 26–27°С на 14–15 сут. По истечении указанного времени определяют конечное содержание нитратов в образце.

Определение содержания нитратов в почве. 50 г почвы помещают в колбу и добавляют 5-кратное количество воды (с учетом влажности образца). Колбу взбалтывают на качалке 3 мин, после чего фильтруют содержимое через складчатый фильтр из плотной фильтровальной бумаги. Первые порции фильтрата отбрасывают или вновь переносят на фильтр. 10–50 $см^3$ (в зависимости от предполагаемого содержания нитратов) чистого прозрачного фильтрата помещают в фарфоровую чашку и выпаривают на водяной бане. К сухому остатку прибавляют 1 $см^3$ дисульфофеноловой кислоты и тщательно растирают стеклянной палочкой. Через 10 мин в чашку добавляют 10 $см^3$ воды, затем при помешивании палочкой несколько капель 15%-ного раствора NaOH до щелочной реакции по лакмусовой бумаге. Если в растворе содержатся нитраты, появляется желтое окрашивание. Полученный раствор переносят в мерную колбу на 100 $см^3$, тщательно перемешивают и доводят дистиллированной водой до метки. В случае очень высоких концентраций раствор можно развести в большем объеме дистиллированной воды. Интенсивность окраски измеряют на электрофотоколориметре, используя синий фильтр (длина волны 435–480 нм). Количество нитратов определяют по калибровочному графику и выражают в миллиграммах азота нитратов на 1 кг почвы (мг/кг).

Построение калибровочного графика. 0,1445 г химически чистого KNO_3 растворяют в 1 $дм^3$ дистиллированной воды, 100 $см^3$ полученного раствора переносят в мерную колбу и доводят водой до 1 $дм^3$. Таким образом, в 1 $см^3$ образцового раствора содержится 0,012 мг NO_3 или 0,002 мг азота нитратов. Возрастающие количества (от 1 до 50 $см^3$) образцового раствора помещают в фарфоровые чашки и выпаривают досуха на водяной бане. Сухой остаток обрабатывают дисульфофеноловой кислотой и раствором NaOH, как описано выше, разводят дистиллированной водой и колориметрируют. Строят график, где на оси абсцисс откладывают показания электрофотоколориметра, а на оси ординат – содержание азота нитратов.



7 БИОРАЗЛАГАЕМЫЕ ПОЛИМЕРНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

7.1. Экологическая опасность синтетических полимеров

Полимерные материалы (пластмассы, композиты, пластики) – это композиции определенного состава, полученные на основе полимеров природного или искусственного происхождения. Полимеры являются связующими веществами, кроме них в составе композиций содержатся наполнители (органические или минеральные), пластификаторы, стабилизаторы, отвердители, красители. Объемы выпуска полимерных материалов достигают 180 млн. т в год и ежегодно возрастают на 25 млн. т.

Преимуществами полимерных материалов и изделий из них являются:

– постоянно пополняемая сырьевая база за счет синтеза новых полимеров с заранее заданными свойствами;

– невысокий расход смол на единицу готовой продукции;

– простота переработки полимерных материалов в изделия любого (даже весьма сложного) профиля с образованием минимума отходов;

– способность полимеров образовывать тонкие прочные пленки;

– широкие технологические возможности получения материалов и изделий с заданными характеристиками, отвечающими функциональным, эксплуатационным, эстетическим и экономическим требованиям;

– ценный комплекс свойств: сочетание легкости и прочности, водо-, паро- и газонепроницаемость, химическая стойкость, электроизоляционные и диэлектрические свойства, эластичность, неподверженность коррозии и др.;

– способность принимать любую окраску и фактуру.

Наряду с этими уникальными свойствами и относительно низкой ценой синтетические полимеры имеют недостатки:

1) подавляющее большинство полимеров производится из невозобновляемого углеводородного сырья, запасы которого ограничены;

2) синтетические полимеры не разлагаются в природных условиях, что приводит к загрязнению окружающей среды и создает проблемы их утилизации.

Экологические мотивы уже заставляют многие страны и регионы ограничивать применение синтетических полимеров. Так, в Тайване (2003 г.), Лос-Анджелесе (2007 г.), Италии (2010 г.) полимерные пакеты запрещены к использованию во всех торговых центрах. С пластиковыми пакетами борются в Кении, Руанде, Танзании. Во многих странах Европы существуют налоги на пластиковые пакеты.

Возможными направлениями переработки отходов синтетических полимерных материалов являются сжигание, пиролиз, рециклинг (повторная переработка), однако основным способом остается депонирование на полигонах.

Сжигание и пиролиз отходов пластмасс кардинально не улучшают экологическую обстановку; рециклинг экологичнее, но требует значительных трудовых и энергетических затрат: отбор пластиков из отходов, разделение их по видам, мойка, сушка, измельчение и только затем переработка. Кроме того, остро стоит вопрос допустимой кратности рециклинга, после чего вновь приходится выбирать между захоронением и сжиганием остатков. Даже в развитых странах повторной переработке подвергается не более 16–20% отходов полимерных материалов.

7.2. Получение биоразлагаемых полимеров

Самым оптимальным решением проблемы утилизации отработанных полимерных материалов, по мнению специалистов, является создание и освоение широкого круга полимеров и композитов с регулируемым сроком службы. Отличительная особенность этих материалов – способность сохранять потребительские свойства в течение всего необходимого периода эксплуатации, после

чего они должны быстро разрушаться в естественных условиях до низкомолекулярных соединений, способных участвовать в природном круговороте веществ. Такие полимерные материалы называют биоразлагаемыми (биодеградабельными, биополимерами). Биополимеры после окончания срока службы должны разрушаться под действием микроорганизмов, высоких температур либо ультрафиолетовой, γ- или электронной радиации.

Создание биоразлагаемых полимерных материалов в настоящее время является приоритетным направлением научно-исследовательских и практических разработок, реализация которых позволит минимизировать загрязнение окружающей среды полимерными отходами. Гиганты современной полимерной индустрии – CargillDow, BAYER AG, Fardis, BASF, EastmanChemical, Stalenco, MY SharpInterpack – заявляют о возможности массового внедрения в быт экологически безопасных пластиков. Во многих странах Европы созданы государственные программы финансовой и законодательной поддержки производства и использования биоразлагаемых полимеров.

За последние годы мировое потребление биополимерных материалов увеличилось в 2 раза, причем наибольшие темпы роста отмечаются в Японии.

На современном этапе выделяют три основных направления в разработке биоразлагаемых пластмасс:

– использование полиэфиров гидроксикарбоновых кислот;

– получение пластических масс на основе воспроизводимого природного сырья;

– придание промышленным полимерным материалам способности биодеградации.

7.2.1. Использование полиэфиров гидроксикарбоновых кислот

Еще в 1925 г. было установлено, что полигидроксимасляная кислота является питательной средой для различных микроорганизмов, разлагающих ее до CO_2 и H_2O. Аналогичные свойства имеют и полиэфиры (полигидроксиалканоаты, ПГА, РНА) других гидроксикарбоновых кислот: гликолевой, молочной, оксивалериановой, оксикапроновой. Особенность данных полимеров – высокая биосовместимость и биодеградация до простых конечных продуктов. В компосте при влажности 85% и температуре 20–60°C

полигидроксиалканоаты разлагаются на воду и углекислый газ за 7–10 недель.

Для получения полиэфиров применяются димеры (гликолиды, лактиды) или лактоны кислот. Кроме того, при росте некоторых микроорганизмов на средах, содержащих питательные вещества, но имеющих дефицит азота или фосфора, микробные клетки начинают синтезировать и накапливать полигидроалканоаты, которые служат им резервом энергии и углерода. Это свойство бактерий используется для промышленного получения ПГА, важнейшими из них являются полигидроксибутират (ПГБ, PHB) и его сополимер с полигидроксивалератом (ПГВ, PHV). Высокопродуктивными и перспективными микроорганизмами, синтезирующими полигидроксиалканоаты, являются представители родов *Alcaligene*, *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Methylomonas*, *Methylobacter*, *Bacillus*.

Первое промышленное производство сополимеров оксимасляной и оксивалериановой кислот организовала в 1980 г. английская компания ICA. Полимер получил название Biopol. Он характеризуется относительной термостабильностью, пропускает кислород, устойчив к агрессивным химикатам и имеет прочность, сопоставимую с полипропиленом. Однако его стоимость в 8–10 раз выше, чем у традиционных пластиков. Поэтому основные сферы применения Biopol – медицина (биоразлагаемые шовные нити, штифты, пленки, капсулы для доставки лекарств), упаковка некоторых парфюмерных товаров, изделия личной гигиены.

Бактерии могут производить не только готовые полимеры, но и сырье – мономеры, из которых уже искусственно можно получать пластики. Самым распространенным биоразлагаемым полимером из этой группы является полимолочная кислота (полилактид, ПМК, PLA). Производство мономера – собственно молочной кислоты – микробиологическим способом дешевле традиционного, так как бактерии синтезируют ее из доступных сахаров в технологически несложном процессе.

Сам полимер молочной кислоты (точнее, смесь двух оптических изомеров одного и того же состава) имеет достаточно высокую термическую стабильность: температуру плавления – 210–220°С, температуру стеклования – около 90°С. Изделия из ПМК характеризуются высокой жесткостью, прозрачностью и блеском, напоминая в этом отношении полистирол. В качестве пластификатора можно использовать сам мономер – молочную кислоту.

Патент на способ промышленного получения ПМК был выдан компании DuPont еще в 1954 г., однако коммерциализация этого биопластика началась лишь в XXI в. В 2002 г. в городе Блэр в США фирмой NatureWork был запущен завод мощностью 140 тыс. т по производству ПМК из глюкозы кукурузного крахмала. Сегодня это крупнейший производитель в мире, его мощности уже достигли 280 тыс. т. В ближайшие 5–10 лет планируется строительство третьего завода, сырьем для которого будут практически бесплатные отходы переработки кукурузы. Продукцию завода в Блэр перерабатывает множество компаний, только в Европе их более 30. В Европе также функционирует несколько заводов по производству ПМК, ряд мелких производителей есть в Азии.

Полилактид самый дешевый из биопластиков, а его свойства определяют широкое применение: он устойчив к действию ультрафиолетового света, плохо воспламеняется и горит с малым выделением дыма. Переработка ПМК возможна практически любыми современными методами вплоть до экструзии пленок. Кроме того, ПМК – полностью биоразлагаемый полимер. Изделия из полилактида при компостировании полностью разлагаются на воду и углекислый газ за 20–90 дней.

Главные области применения ПМК – упаковка (сумки, тара для пищевых продуктов), бутылки для молока, соков, воды, но не газированных напитков, так как полилактид пропускает углекислый газ. Из ПМК также изготавливают игрушки, корпусы сотовых телефонов, компьютерные мышки и ткани.

Сравнительный анализ полигидроксиалканоатов и полимеров молочной кислоты позволяет выявить ряд преимуществ ПГА:

1) ПГА в отличие от ПМК получают методом прямой ферментации, их производство не требует серии технологических этапов (синтез мономеров, полимеризация, добавление пластификаторов и модифицирующих компонентов);

2) сырьем для синтеза ПГА могут быть сахара, органические кислоты, спирты, смеси CO_2 и H_2, продукты гидролиза растительного сырья, промышленные отходы производства сахара, пальмового масла, водородсодержащие продукты переработки бурых углей и гидролизного лигнина;

3) ПГА – это семейство полимеров различной химической структуры, образованных мономерами с длиной углеродной цепи

от C_4 до C_{12} и выше, от высококристалличных термопластов до резиноподобных эластомеров;

4) свойствами ПГА (кристалличность, механическая прочность, температурные характеристики, скорости биораспада) можно управлять, варьируя в процессе ферментации состав среды;

5) ПГА подвергаются переработке из различных фазовых состояний (порошки, растворы, гели, расплавы) общепринятыми методами;

6) ПГА не гидролизуются в жидких средах, так как деградация ПГА является истинно биологической и происходит клеточным и гуморальным путями, более того, скоростью деградации ПГА можно управлять.

7.2.2. Получение пластических масс на основе воспроизводимого природного сырья

Направление по применению природных полимеров интересно тем, что ресурсы исходного сырья постоянно возобновляются и практически не ограничены.

Получают композиционные материалы на основе крахмала, целлюлозы, хитозана, белков, используют различные добавки. Соотношение компонентов в смеси определяет биоразлагаемость всей системы, физико-механические свойства и цену.

Наиболее широко из ряда природных соединений в биоразлагаемых материалах применяется крахмал. Пластические массы на основе крахмала обладают высокой экологичностью и способностью разлагаться в компосте при 30°С в течение 2 месяцев с образованием благоприятных для растений продуктов распада.

С целью снижения себестоимости биоразлагаемых материалов для изделий бытового назначения (упаковка, пленка для мульчирования в агротехнике, пакеты для мусора) используется неочищенный крахмал, смешанный с поливиниловым спиртом и тальком.

Добавки способствуют получению материалов с определенными свойствами. Так, например, для изготовления водорастворимой пленки из смеси крахмала и пектина в состав композиции вводят пластификаторы: глицерин или полиоксиэтиленгликоль, причем с увеличением содержания крахмала повышается хрупкость пленки. Из смеси, содержащей крахмал, амилозу и незначительное количество слабых кислот, методом экструзии получают листы – полуфабрикат для изготовления упаковки. Вспененные листы получают из композиции, содержащей гранулированный

крахмал и водный раствор поливинилового спирта. Лучшие показатели прочности, гибкости и водостойкости имеют образцы, содержащие 10–30% поливинилового спирта. Такая смесь разлагается в почве за одну неделю. Вспененные изделия также производят на основе двух биоразлагаемых компонентов: крахмала и полиэфира гидроксикарбоновых кислот.

Устойчивые к действию воды биоразлагаемые композиции получают из смеси эфиров крахмала и полиоксиэтиленгликоля, в которой часть полиэтиленгликоля заменяют полиоксибутиратом. Пленка на основе деструктированного крахмала, пропитанного сополимером этилена с виниловым спиртом и алифатическими полиэфирами, обладает высокой прочностью и сохраняет свои свойства при температуре 50°С в течение 3 месяцев.

Полимеры на основе целлюлозы с эпоксидными соединениями и ангидридами дикарбоновых кислот полностью разлагаются в компосте за 4 недели. Из них делают емкости для воды, разовую посуду, пленки для мульчирования.

Бинарные и тройные смеси, предназначенные для формования и литья, производят из сложного эфира целлюлозы, алифатического полиэфира и биодеструктируемой добавки монокристаллической целлюлозы или крахмала в количестве не более 50% от общей массы.

Особо интересны и перспективны биоразлагаемые смеси, содержащие хитозан и целлюлозу. При содержании в такой смеси 10–20% хитозана получается пленка с хорошей прочностью и водостойкостью, которая полностью растворяется и исчезает в почве за 2 месяца. Плотность такого пластика – 0,1–0,3 г/см^3. Биодеградируемость пленок на основе хитозана, в зависимости от методов его обработки, может достигать 28 дней.

Из тройной композиции (хитозан, микроцеллюлозное волокно, желатин) получают биоразлагаемые пленки повышенной прочности. Сухая полупрозрачная пленка имеет прочность 133 Н/мм^2, а мокрая – 21 Н/мм^2.

Полимерные пленки, пластифицированные глицерином, эластичны и могут адсорбировать водяной пар.

Биодеградируемые материалы для упаковки пищевых продуктов, парфюмерии и лекарственных препаратов получают также на основе метакрилированного желатина. Термопластичные биоразлагаемые композиции производят с казеином, производными серина, кератиносодержащими натуральными продуктами.

7.2.3. Придание промышленным полимерным материалам способности к биодеградации

Придание биоразлагаемости многотоннажным промышленным полимерам (полиэтилену, полипропилену, поливинилхлориду, полистиролу и полиэтилентерефталату) в настоящее время реализуется в трех направлениях:

– введение в состав пластиков веществ с функциональными группами, способствующими ускоренному фоторазложению полимера (разложение под действием света);

– разработка композиций многотоннажных полимеров с биоразлагаемыми природными добавками, способными инициировать распад основного полимера;

– направленный синтез биодеградируемых пластических масс (полиэфиры, полиэфирамиды, сополимеры алифатических диолов и дикарбоновых кислот).

Инициатором фотораспада полиэтилена или полистирола могут быть винилкетоновые мономеры. Введение их в количестве 2–5% в качестве сополимера позволяет получать пластические массы со свойствами, близкими к исходным полимерам, но разлагающиеся под действием ультрафиолетового света.

При введении в полиолефиновые композиции светочувствительных добавок (дитиокарбамата железа и никеля или соответствующих пероксидов) получают пленки для мульчирования.

Целлюлозная пульпа, алкилкетоны и вещества, содержащие карбонильные группы, являются катализаторами фото- и биоразложения пленок на основе полиэтилена, полипропилена и полиэтилентерефталата. Фото- и биоразложение таких пленок начинается через 8–12 недель, остатки пленки полностью исчезают при бороновании и запахивании, разрыхляя при этом почву.

При введении добавок, способствующих разложению полимеров, возникают две проблемы: во-первых, добавки должны допускать обработку полимера традиционными способами (литье, формование, выдув, экструзия), при этом полимеры не должны разлагаться, хотя подвергаются температурной обработке; во-вторых, добавка должна ускорять разложение полимера на свету, но обеспечивать длительный период его использования тоже на свету. Современные добавки допускают типовые способы обработки полимеров, но при условии, что время нахождения сырья в зоне нагрева не должно превышать 7–12 мин.

Применение добавок целесообразно в тех изделиях, которые часто и массово используются и выбрасываются. Это пакеты, сельскохозяйственные и упаковочные пленки, одноразовая посуда, бутылки и т. п. Поэтому наиболее популярные полимеры для применения с добавками – это полиэтилен, полипропилен, ПЭТФ.

Очевидным на первый взгляд способом придания биоразлагаемости традиционным синтетическим полимерам представляется их компаундирование (смешивание) с биоразлагаемыми компонентами. В качестве таковых в смесях с промышленными полимерами используются крахмал, полиэфиры и другие добавки. Но такие композиции не являются биоразлагаемыми, так как при их компостировании наблюдается быстрое разложение крахмала, а синтетический полимер в большинстве случаев не подвергается разложению. Поэтому проблема обеспечения биоразлагаемости синтетических полимеров путем введения в их состав природных компонентов в настоящее время не привлекает особого интереса.

Основным направлением получения биодеградируемых синтетических пластиков является синтез соответствующих полиэфиров и полиэфирамидов. Лидеры в подобных разработках – компании BASF и BAYER AG. Разлагаемые сополиэфиры получают на основе алифатических диолов и органических дикарбоновых кислот. При содержании терефталевой кислоты на уровне 30–55% полиэфир сохраняет биоразлагаемость и обладает физико-механическими показателями, обеспечивающими практическое использование полимера.

Прозрачный хорошо формуемый биоразлагаемый сополиэфир для получения пленок и листов синтезируют полимеризацией с раскрытием цикла и переэтерификацией лактида с ароматическими полиэфирами на основе тере(изо)фталевой кислоты и алифатических диолов. Также разработаны биоразлагаемые композиции с хорошими физико-механическими свойствами и приемлемой ценой, содержащие полиэфир-полиамидные, уретановые, карбонатные группы и фрагменты гидроксикарбоновых кислот.

Как и традиционные пластики, биополимеры могут применяться для производства разнообразнейшей продукции. В основном биоматериалы востребованы в упаковочной и волоконной отраслях. В табл. 6.1 показаны преимущества использования биоразлагаемых полимеров.

Таблица 7.1

Преимущества использования биополимеров в различных производствах

Область применения (продукция)	Преимущества
Упаковка (фольга, пленка, бутылки, блистеры, сети, пакеты)	Идеально подходит для упаковки продуктов, рассчитанных на небольшие сроки хранения
Рестораны, фастфуд (посуда, столовые приборы, соломки)	Экономическая выгодность одноразовых изделий и отсутствие вредных воздействий при их контакте с продуктами
Волоконное производство, текстиль (одежда, технический текстиль, волокно)	«Дышащие», приятные на ощупь, блестящие ткани
Игрушки	Экологическая безопасность
Бытовая продукция (мешки для органического мусора, средства личной гигиены)	«Натуральные» легко разлагающиеся материалы
Сельское хозяйство (разнообразные пленки, укрывающие материалы, горшки для цветов, упаковка для семян)	Экономичные материалы, не требующие больших затрат на переработку
Медицина (имплантанты, операционные материалы, средства гигиены полости рта, перчатки)	Гигиеничность и короткий срок использования
Технологические установки, канцелярские товары	Широкий спектр способов обработки и низкие затраты на утилизацию за счет возможности компостирования

Несмотря на достаточно высокую стоимость биополимеров (4,5–8,0 долл./кг), такие материалы уверенно завоевывают массовые потребительские рынки, поскольку применяемые для их производства обновляемые ресурсы экономически выгоднее нефтепродуктов.

Производители заявляют, что при совершенствовании технологии стоимость биоразлагаемых полимеров можно уменьшить до 1,5 долл./кг, что открывает большие перспективы для сельского хозяйства, пищевой, химической и полимерной промышленности.

Общие объемы мирового производства биоразлагаемых пластиков на данный момент достигли 250 тыс. т, а потребность в подобных материалах составляет около 60 тыс. т в год, и эта цифра постоянно увеличивается.

Согласно статистике, в странах Евросоюза из 35 млн. т потребляемых пластиков около 30% используется в сфере упаковки.

Инновационные разработки в этой области прежде всего требуют применения биополимерных материалов, поскольку такие пластмассы не оказывают вредного влияния на продукты при контакте, а их способность к компостированию не сокращает сроков хранения товаров в холодильнике.

Многие супермаркеты и торговые сети переходят на упаковку из биоразлагаемых материалов, что позволяет производителям наращивать их производство. Так, компания BASF заявила, что планирует существенно увеличить производство биополимера Ecoflex (в настоящее время его выпуск составляет 8 тыс. т в год). Специалисты компании прогнозируют рост спроса на Ecoflex в ближайший период до 100 тыс. т в год.

Продвижение на рынок биоразлагаемых пластиков, как и любых других инновационных разработок, сталкивается с определенными барьерами. Кроме неизбежных бюрократических проволочек (установления стандартов качества, процедур тестирования), биополимеры проигрывают промышленно освоенным пластмассам в цене за счет сравнительно небольших мощностей производств.

Но идея использования возобновляемых ресурсов и применения в производстве «природных циклов», несомненно, заслуживает доверия и внимания.

7.3. Методы оценки биоразлагаемости полимеров

Тот факт, что первые разработанные биоразлагаемые полимеры не разлагались надлежащим образом, заставил Американское общество по испытанию материалов сформулировать само понятие «биоразлагаемость»: «способность подвергаться разложению на углекислый газ, метан, воду, неорганические компаунды или биомассы, при котором преобладающим механизмом является энзимное действие микроорганизмов, которое можно измерить с помощью стандартизированных испытаний в течение определенного периода времени с отражением имеющихся условий утилизации».

Многие так называемые биоразлагаемые полимеры являются на самом деле биоэродируемыми, гидробиоразлагаемыми или же

фотобиоразлагаемыми, т. е. подверженными (хотя бы на первой стадии) растворению в воде, окислительному или ультрафиолетовому охрупчиванию (переходу из вязкого состояния в хрупкое). Для характеристики таких полимеров более уместным является термин «экологически разлагаемые полимеры».

По мере увеличения объемов выпуска биоразлагаемых полимерных материалов важное значение приобретает разработка нормативных требований, касающихся методологии испытаний и количественного определения параметров процесса разложения таких материалов.

Методы оценки биоразлагаемости полимерных материалов можно классифицировать по различным признакам:

1) в зависимости от условий проведения испытаний: лабораторные и натурные (в естественных условиях);

2) по продолжительности: длительные и экспресс-методы;

3) исходя из уровня регламентации: стандартизованные и нестандартизованные;

4) в соответствии с определяемым параметром полимерных материалов: масса, деформационно-прочностные показатели, степень деградации макро-, микро- и молекулярной структуры образцов, молекулярно-массовое распределение полимерного связующего и др.;

5) по составу и свойствам биологической системы, в которой протекает деструкция: дыхательная активность (по потреблению кислорода или выделению диоксида углерода), выделение биогаза в анаэробных условиях, кислотность, химический и микробиологический состав почвы или другой среды.

В приложении Б приведен перечень международных стандартов по определению способности полимерных материалов к полному аэробному биологическому разложению в водной среде, в почве или в условиях компостирования, а также способности к полному анаэробному разложению.

Наиболее простым и недорогим, не требующим специального оборудования является метод определения степени разложения пластмассовых материалов в имитированных условиях компостирования при лабораторных испытаниях (ISO 20100:2004). В соответствии с данным методом готовится синтетический отход, который инокулируется зрелым компостом, обеспечивающим достаточное количество микроорганизмов. Проверяемый полимерный материал измельчают, смешивают с синтетическим отходом и по-

мещают смесь в реактор, обеспечивающий эффективный газообмен, поддержание влажности (55%) и мезофильный (25°С) или термофильный (58°С) температурный режим. О степени деструкции проверяемого полимерного материала судят по убыли массы.

7.4. Лабораторная работа. Определение степени деструкции растительных отходов и пластмасс в условиях компостирования

Вопросы для самоподготовки. 1. Экологическая опасность синтетических полимеров. 2. Преимущества биоразлагаемых полимерных материалов, направления их разработки. 3. Получение полиэфиров гидроксикарбоновых кислот. 4. Сравнительный анализ полигидроксиалканоатов и полимеров молочной кислоты. 5. Характеристика природного сырья для получения пластических масс. 6. Влияние применяемого природного сырья на свойства пластических масс. 7. Способы придания промышленным полимерным материалам способности к биодеградации. 8. Преимущества использования биополимеров. 9. Методы оценки биоразлагаемости полимеров. 10. Микробиологические и биохимические аспекты процесса компостирования. 11. Оптимальные параметры процесса компостирования.

Цель работы – установление степени деструкции растительных отходов и пластмасс в условиях компостирования.

Порядок выполнения работы. Подготовить отходы к компостированию. Провести компостирование с периодическим перемешиванием и контролем влажности. Установить степень деструкции растительных отходов и пластмасс. Сделать заключение о способности пластмасс к биодеструкции.

7.4.1. Подготовка растительных отходов и пластмасс к компостированию

Реактивы, материалы и оборудование: нитрат аммония; двойной суперфосфат ($Ca(H_2PO_4)_2$); хлорид калия; полимерный материал; солома; отходы растениеводства; древесные опилки; кора древесины; вакуумный сушильный шкаф; эксикатор; бюкс.

Ход анализа. В качестве компостируемого растительного материала используют солому, отходы растениеводства, древесные опилки, кору хвойно-лиственных пород древесины и др. В отходах определяют влажность (см. п. 7.4.1.1), содержание легко- и трудногидролизуемых полисахаридов (см. п. 7.4.1.2 и 7.4.1.3).

Для компостирования берут 1 кг отходов известной влажности, добавляют воду до влажности 55%, смешивают с солями, содержащими азот, фосфор и калий. Используют нитрат аммония, двойной суперфосфат ($Ca(H_2PO_4)_2$) и хлорид калия с таким расчетом, чтобы обеспечить содержание основных элементов в количестве, приведенном в табл. 7.2. В растительные отходы вносят измельченный полимерный материал, который проверяют на способность к биодеструкции.

Таблица 7.2

Содержание основных элементов в компостируемом материале

Номер варианта	Содержание элемента, % от абсолютно сухого вещества		
	N	P (в пересчете на P_2O_5)	K (в пересчете на K_2O)
1	1,0	0,25	0,25
2	1,5	0,50	0,25
3	2,0	0,75	0,25

Полимерный материал берут в количестве 0,5–2,0% от массы растительных отходов. Степень измельчения полимерного материала зависит от его толщины. При толщине <5 мм размер кусков должен составлять 25×25 мм, если толщина материала от 5 до 10 мм, его измельчают до кусков 15×15 мм. Материал высушивают под вакуумом при (40 ± 2)°С до постоянной массы, записывают исходную массу ($m_{\text{п.исх}}$). Перед смешиванием с растительными отходами замачивают проверяемый материал в дистиллированной воде не менее чем на 30 с.

7.4.1.1. Установление влажности отходов и доведение ее до требуемого значения. Бюкс с крышкой высушивают в сушильном шкафу при температуре 105°С до постоянной массы. В бюкс помещают навеску растительного материала массой около 1 г и сушат при тех же условиях на протяжении 3 ч. После охлаждения бюкса в эксикаторе его взвешивают, снова сушат в течение 1 ч и взвешивают. Так повторяют до неизменной массы.

Расчет влажности отходов. Влажность отходов W, %, рассчитывают по формуле

$$W = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m} \cdot 100,$$

где m_1 – масса бюкса с навеской до высушивания, г; m_2 – масса бюкса с навеской после высушивания, г; m – масса пустого бюкса, г.

Расчет количества воды для увлажнения отходов. Количество воды $M_{\text{воды}}$, г, для увлажнения отходов вычисляют по формуле

$$M_{\text{воды}} = \frac{M \cdot (100 - W)}{100 - W_{\text{тр}}} - M,$$

где M – исходная масса отходов, г; W – исходная влажность отходов, %; $W_{\text{тр}}$ – требуемая влажность отходов, % (принимается 55%).

7.4.1.2. Установление легкогидролизуемых полисахаридов.

Реактивы и оборудование: 2%-ный раствор соляной кислоты; 0,1%-ный водный раствор метилового оранжевого; коническая колба емкостью 500 см^3; обратный холодильник; колба Бунзена; воронка Бюхнера; мерная колба на 500 см^3; эбулиостат; бюретка.

Ход анализа. Навеску растительных отходов известной влажности массой около 5 г помещают в коническую колбу емкостью 500 см^3, прибавляют 200 см^3 2%-ного раствора соляной кислоты и кипятят с обратным холодильником в течение 3 ч. После окончания гидролиза проводят фильтрование на воронке Бюхнера с бумажным фильтром. Остаток на фильтре промывают горячей водой до отрицательной реакции на кислоту по метиловому оранжевому, нанося каплю его раствора из капельницы на остаток на фильтре. В присутствии кислоты индикатор принимает красноватый оттенок, в этом случае промывку продолжают. Если индикатор не изменяет цвета, промывку считают законченной, промытый остаток на фильтре используют для установления трудногидролизуемых полисахаридов. Фильтрат и промывные воды переносят в мерную колбу емкостью 500 см^3, после охлаждения доводят объем дистиллированной водой до метки и тщательно перемешивают. В полученном растворе определяют содержание редуцирующих веществ (РВ) эбулиостатическим методом (см. п. 5.3.6).

Массовую долю легкогидролизуемых полисахаридов $X_{\text{л}}$, %, по отношению к абсолютно сухому сырью рассчитывают по формуле

$$X_{\text{л}} = \frac{c_{\text{л}} \cdot k_{\text{л}} \cdot V \cdot \rho \cdot 100}{g \cdot 100},$$

где $c_{\text{л}}$ – массовая доля РВ в гидролизате легкогидролизуемых полисахаридов, %; $k_{\text{л}}$ – коэффициент пересчета моносахаридов в полисахариды (для расчетов используют $k_{\text{л}} = 0{,}89$ для гидролизатов древесины хвойных пород и $k_{\text{л}} = 0{,}88$ для гидролизатов древесины лиственных пород); V – объем гидролизата, см^3 (500 см^3); ρ – плотность гидролизата, г/см^3 (принимают 1 г/см^3); g – масса абсолютно сухой навески растительных отходов, г.

7.4.1.3. Установление трудногидролизуемых полисахаридов.

Реактивы и оборудование: 80%-ный раствор H_2SO_4; 20%-ный раствор NaOH; 0,1%-ный водный раствор метилового оранжевого; обратный холодильник; колба Бунзена; воронка Бюхнера; эбулиостат; бюретка; стакан емкостью 100 см^3; коническая колба емкостью 1 дм^3; мерная колба на 100 см^3.

Ход анализа. Остаток растительных отходов после гидролиза легкогидролизуемых полисахаридов и промывки (см. п. 7.4.1.2) количественно переносят с фильтра в стакан емкостью 100 см^3 и подсушивают при температуре 50–60°С до воздушно-сухого состояния, после чего обрабатывают 35–40 см^3 80%-ного раствора H_2SO_4 при комнатной температуре в течение 3 ч, периодически помешивая стеклянной палочкой. Смесь из стакана количественно переносят в коническую колбу емкостью 1 дм^3, промывая дистиллированной водой в количестве 600 см^3. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и кипятят на протяжении 3 ч. После окончания дополнительного гидролиза раствор фильтруют через воронку Бюхнера с бумажным фильтром. Остаток на фильтре промывают небольшими порциями горячей воды до отрицательной реакции на кислоту по метиловому оранжевому.

Фильтрат и промывные воды переносят в мерную колбу емкостью 1 дм^3, после охлаждения доводят объем дистиллированной водой до метки и тщательно перемешивают.

Из полученного раствора отбирают пипеткой 50 см^3 в мерную колбу на 100 см^3 и осторожно (по каплям) при постоянном перемешивании нейтрализуют 20%-ным раствором NaOH по метиловому оранжевому. Объем раствора доводят до метки дистиллированной водой. В нейтрализованном растворе содержание редуцирующих веществ устанавливают эбулиостатическим методом (см. п. 5.3.6).

Массовую долю трудногидролизуемых полисахаридов $X_т$, %, по отношению к абсолютно сухому сырью находят по формуле

$$X_т = \frac{c_т \cdot k_т \cdot V \cdot \rho \cdot n \cdot 100}{g \cdot 100},$$

где $c_т$ – массовая доля РВ в нейтрализованном гидролизате трудногидролизуемых полисахаридов, %; $k_т$ – коэффициент пересчета моносахаридов в полисахариды ($k_т$ = 0,90); V – общий объем кислого гидролизата, см^3 (1000 см^3); ρ – плотность гидролизата, г/см^3 (принимают 1 г/см^3); n – разбавление гидролизата при нейтрализации (n = 100 / 50 = 2); g – масса абсолютно сухой навески растительных отходов, г.

7.4.2. Компостирование растительных отходов и пластмасс

Оборудование: коробка с отверстиями; термостат.

Ход анализа. Подготовленную к компостированию смесь растительных отходов и пластмасс равномерным слоем, без уплотнения, размещают в реакторе для компостирования. Реактор представляет собой коробку из полипропилена размером 30×20×10 см. Газообмен в коробке обеспечивается двумя отверстиями диаметром 5 мм, проделанными на расстоянии 6,5 см от дна в двух противоположных стенках по ширине коробки. Во избежание испарения коробку закрывают крышкой и оклеивают скотчем.

Коробку с материалом помещают в термостат для поддержания термофильных условий ((58 ± 2)°С) на 45–90 сут. В процессе компостирования наблюдают за внешним видом материала, при необходимости добавляют воду, материал должен быть увлажненным, но без свободной влаги (табл. 7.3). В первые 2–3 сут появляется кислый запах, затем на 5–10 сут – аммонийный, после 10 сут компостирования запах становится землистым либо исчезает. В течение первых двух недель формируется мицелий, наблюдается потемнение материала.

7.4.3. Установление степени деструкции растительных отходов и пластмасс

Оборудование: вакуумный сушильный шкаф; термостат; сита с размерами отверстий 10, 5, 2 мм; аналитические весы.

Ход анализа. По истечении времени компостирования содержимое реактора подсушивают при температуре (58 ± 2)°С

и циркуляции воздуха до постоянной массы. Полученный компост просеивают через сито, начиная с размера отверстий 10 мм, затем 5 и 2 мм. Каждый раз собирают с сита остатки полимерного материала, очищают их от компоста, промывают водой, высушивают при (40 ± 2)°С под вакуумом до постоянной массы. Отдельно собирают гумифицированные остатки растительного материала, определяют массу, влажность, содержание легко- и трудногидролизуемых полисахаридов, гумусовых веществ (см. п. 7.4.4).

Таблица 7.3

Режим увлажнения компостируемого материала

Сутки компостирования	Операция
0	Записывают начальную массу реактора
1, 2, 3, 4, 7, 9, 11, 14	Взвешивают реактор, при необходимости добавляют воду до первоначальной массы. Перемешивают компостируемую смесь
8, 10, 16, 18, 21, 23, 25, 28	Взвешивают реактор, при необходимости добавляют воду до первоначальной массы. Не перемешивают
30, 45	Взвешивают реактор, при необходимости добавляют воду до 80% первоначальной массы. Перемешивают компостируемую смесь
От 30 до 60, 2 раза в неделю	Взвешивают реактор, при необходимости добавляют воду до 80% первоначальной массы. Не перемешивают
От 60, 2 раза в неделю	Взвешивают реактор, при необходимости добавляют воду до 70% первоначальной массы. Не перемешивают

Степень деструкции пластмасс D, %, рассчитывают по формуле

$$D = \frac{m_{\text{п.кон}}}{m_{\text{п.исх}}} \cdot 100,$$

где $m_{\text{п.кон}}$ – масса полимерного материала после компостирования, г; $m_{\text{п.исх}}$ – исходная масса полимерного материала, г.

Коэффициент уменьшения массы растительных отходов $K_{\text{м}}$ вычисляют по формуле

$$K_{\text{м}} = \frac{m_{\text{р.исх}} \cdot (100 - W_{\text{исх}}) - m_{\text{р.кон}} \cdot (100 - W_{\text{кон}})}{m_{\text{р.исх}} \cdot (100 - W_{\text{исх}})},$$

где $m_{\text{р.исх}}$ – исходная масса растительных отходов, г; $W_{\text{исх}}$ – исходная влажность растительных отходов, %; $m_{\text{р.кон}}$ – масса гумифици-

рованных растительных отходов, г; $W_{кон}$ – влажность гумифицированных растительных отходов, %.

Степень деструкции углеводного комплекса растительных отходов рассчитывают по легко- и трудногидролизуемым полисахаридам.

Коэффициент деструкции легкогидролизуемых полисахаридов $K_л$ определяют по формуле

$$K_л = 1 - \frac{X_{л.кон} \cdot (1 - K_м)}{X_{л.исх}},$$

где $X_{л.кон}$ – содержание легкогидролизуемых полисахаридов после компостирования, %; $K_м$ – коэффициент уменьшения массы растительных отходов; $X_{л.исх}$ – содержание легкогидролизуемых полисахаридов в исходных растительных отходах, %.

Коэффициент деструкции трудногидролизуемых полисахаридов $K_т$ находят по формуле

$$K_т = 1 - \frac{X_{т.кон} \cdot (1 - K_м)}{X_{т.исх}},$$

где $X_{т.кон}$ – содержание трудногидролизуемых полисахаридов после компостирования, %; $X_{т.исх}$ – содержание трудногидролизуемых полисахаридов в исходных растительных отходах, %.

7.4.4. Установление содержания в компосте гумусовых веществ

Реактивы и оборудование: 0,1 н. раствор NaOH; 10%-ный раствор HCl; сушильный шкаф; коническая колба емкостью 500 см^3; обратный холодильник; водяная баня; стеклянный фильтр с диаметром пор 100 мкм.

Ход анализа. Навеску гумифицированных растительных отходов (6 г) известной влажности помещают в коническую колбу емкостью 500 см^3 и заливают 0,1 н. раствором NaOH в количестве 200 см^3. После присоединения к колбе обратного холодильника реакционную смесь выдерживают на водяной бане при температуре 80°С в течение 1,5 ч. Содержимое колбы охлаждают при комнатной температуре и отстаивают на протяжении суток. После этого жидкость декантируют, а к остатку добавляют свежую порцию раствора NaOH и снова выдерживают на водяной бане при температуре 80°С в течение 1 ч. Колбу с реакционной массой охлаждают и выдерживают при комнатной температуре на протяжении

суток, после чего разделяют твердую и жидкую часть фильтрованием через предварительно взвешенный бумажный фильтр. Остаток на фильтре промывают горячей дистиллированной водой до нейтральной реакции, высушивают в сушильном шкафу при температуре 100°С до постоянной массы.

Массовую долю гумусовых веществ $M_{г.в}$, %, рассчитывают по формуле

$$M_{г.в} = \frac{m_{исх} - m_{кон}}{m_{исх}} \cdot 100,$$

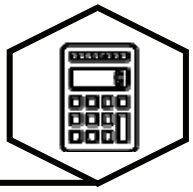
где $m_{исх}$ – исходная масса гумифицированных растительных отходов, г; $m_{кон}$ – масса отходов после обработки щелочью, г.

Фильтраты смешивают с промывными водами, тщательно перемешивают и постепенно, при перемешивании, приливают к ним 10%-ный раствор HCl до достижения значения pH 1–2. После отстаивания отделяют полученный осадок от раствора фульвокислот фильтрованием на стеклянном фильтре с диаметром пор 100 мкм. Осадок (гуминовые кислоты) промывают дистиллированной водой до нейтральной реакции и высушивают до воздушно-сухого состояния.

Выход гуминовых кислот $M_{г.к}$, %, определяют по формуле

$$M_{г.к} = \frac{m_{г.к}}{m_{исх}} \cdot 100,$$

где $m_{г.к}$ – масса гуминовых кислот, выделенных из навески гумифицированных отходов, г; $m_{исх}$ – исходная масса гумифицированных растительных отходов, г.



ПРИЛОЖЕНИЕ А

Равновесные концентрации кислорода

Темпе-ратура, °С	Растворенный кислород, мг/дм^3									
	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
0	14,65	14,61	14,57	14,53	14,49	14,45	14,41	14,37	14,33	14,29
1	14,25	14,21	14,17	14,13	14,09	14,05	14,02	13,98	13,94	13,90
2	13,86	13,82	13,79	13,75	13,71	13,68	13,64	13,60	13,56	13,53
3	13,49	13,46	13,42	13,38	13,35	13,31	13,28	13,24	13,20	13,17
4	13,13	13,10	13,06	13,03	13,00	12,96	12,93	12,89	12,86	12,82
5	12,79	12,76	12,72	12,69	12,66	12,62	12,59	12,56	12,53	12,49
6	12,46	12,43	12,40	12,36	12,33	12,30	12,27	12,24	12,21	12,18
7	12,14	12,11	12,08	12,05	12,02	11,99	11,96	11,93	11,90	11,87
8	11,84	11,81	11,78	11,75	11,72	11,70	11,67	11,64	11,61	11,58
9	11,55	11,52	11,49	11,47	11,44	11,41	11,38	11,35	11,33	11,30
10	11,27	11,24	11,22	11,19	11,16	11,14	11,11	11,08	11,06	11,03
11	11,00	10,98	10,95	10,93	10,90	10,87	10,85	10,82	10,80	10,77
12	10,75	10,72	10,70	10,67	10,65	10,62	10,60	10,57	10,55	10,52
13	10,50	10,48	10,45	10,43	10,40	10,38	10,36	10,33	10,31	10,28
14	10,26	10,24	10,22	10,19	10,17	10,15	10,12	10,10	10,08	10,06
15	10,03	10,01	9,99	9,97	9,95	9,92	9,90	9,88	9,86	9,84
16	9,82	9,79	9,77	9,75	9,73	9,71	9,69	9,67	9,65	9,63
17	9,61	9,58	9,56	9,54	9,52	9,50	9,48	9,46	9,44	9,42
18	9,40	9,38	9,36	9,34	9,32	9,30	9,29	9,27	9,25	9,23
19	9,21	9,19	9,17	9,15	9,13	9,12	9,10	9,08	9,06	9,04
20	9,02	9,00	8,98	8,97	8,95	8,93	8,91	8,90	8,88	8,86
21	8,84	8,82	8,81	8,79	8,77	8,75	8,74	8,72	8,70	8,68
22	8,67	8,65	8,63	8,62	8,60	8,58	8,56	8,55	8,53	8,52
23	8,50	8,48	8,46	8,45	8,43	8,42	8,40	8,38	8,37	8,35
24	8,33	8,32	8,30	8,29	8,27	8,25	8,24	8,22	8,21	8,19
25	8,18	8,16	8,14	8,13	8,11	8,11	8,08	8,07	8,05	8,04
26	8,02	8,01	7,99	7,98	7,96	7,95	7,93	7,92	7,90	7,89
27	7,87	7,86	7,84	7,83	7,81	7,80	7,78	7,77	7,75	7,74
28	7,72	7,71	7,69	7,68	7,66	7,65	7,64	7,62	7,61	7,59
29	7,58	7,56	7,55	7,54	7,52	7,51	7,49	7,48	7,47	7,45
30	7,44	7,42	7,41	7,40	7,38	7,37	7,35	7,34	7,32	7,31

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Перечень международных стандартов по определению способности полимерных материалов к биодеструкции

Номер стандарта	Название стандарта
ISO 14851:1999	Пластмассы. Определение способности к полному аэробному биологическому разложению в водной среде. Метод с измерением потребления кислорода в закрытом респирометре
ISO 14851:1999/Cor 1:2005	Пластмассы. Определение способности к полному аэробному биологическому разложению в водной среде. Метод с измерением потребления кислорода в закрытом респирометре. Техническая поправка 1
ISO 14852:1999	Пластмассы. Определение способности к полному аэробному биологическому разложению в водной среде. Метод с анализом выделяемого диоксида углерода
ISO 14852:1999/Cor 1:2005	Пластмассы. Определение способности к полному аэробному биологическому разложению в водной среде. Метод с анализом выделяемого диоксида углерода. Техническая поправка 1
ISO 14853:2005	Пластмассы. Определение полного анаэробного биоразрушения пластмасс в водной системе. Метод с применением измерения выделяемого биогаза
ISO 14853:2005/Cor 1:2009	Пластмассы. Определение полного анаэробного биоразрушения пластмасс в водной системе. Метод с применением измерения выделяемого биогаза. Техническая поправка 1
ISO 14855-1:2012	Пластмассы. Определение способности к полному аэробному биологическому разложению и распаду в контролируемых условиях компостирования. Метод с применением анализа выделяемого диоксида углерода. Часть 1. Общий метод

Окончание таблицы

Номер стандарта	Название стандарта
ISO 14855-2:2007	Пластмассы. Определение способности к полному аэробному биологическому разложению в контролируемых условиях компостирования. Метод с применением анализа выделяемого диоксида углерода. Часть 2. Гравиметрическое измерение диоксида углерода, выделяемого при лабораторном испытании
ISO 14855-2:2007/Cor 1:2009	Пластмассы. Определение способности к полному аэробному биологическому разложению в контролируемых условиях компостирования. Метод с применением анализа выделяемого диоксида углерода. Часть 2. Гравиметрическое измерение диоксида углерода, выделяемого при лабораторном испытании. Техническая поправка 1
ISO 17556:2012	Пластмассы. Определение максимальной способности к аэробному микробиологическому разрушению в почве путем измерения респирометром потребности в кислороде или количества выделяемого диоксида углерода
ISO 20200:2004	Пластмассы. Определение степени разложения пластмассовых материалов в имитированных условиях компостирования при лабораторных испытаниях

ЛИТЕРАТУРА

1. Ручай, Н. С. Экологическая биотехнология: учеб. пособие / Н. С. Ручай, Р. М. Маркевич. – Минск: БГТУ, 2006. – 312 с.

2. Ручай, Н. С. Промышленная биотехнология: электронный конспект курса лекций / Н. С. Ручай, О. В. Остроух. – Минск: БГТУ, 2012. – 88 с.

3. Ацидофикация (преферментация) сырого осадка как метод стабилизации очистки московских сточных вод от биогенных элементов [Электронный ресурс]. – М., 2014. – Режим доступа: http://www.mosvodokanal.ru/forexperts/articles/5838#. – Дата доступа: 18.03.2015.

4. Долина, Л. Ф. Очистка сточных вод от биогенных элементов: монография / Л. Ф. Долина. – Днепропетровск: Континент, 2011. – 198 с.

5. Трунов, П. В. Особенности процесса очистки сточных вод в погружных мембранных биореакторах / П. В. Трунов // Коммунальное хозяйство городов: науч.-техн. сб. – Киев: Техника, 2010. – Вып. 93. – С. 133–137.

6. Емельянова, И. З. Химико-технический контроль гидролизных производств / И. З. Емельянова. – М.: Лесная пром-сть, 1976. – 328 с.

7. Лурье, Ю. Ю. Химический анализ производственных сточных вод / Ю. Ю. Лурье, А. И. Рыбникова. – М.: Химия, 1974. – 336 с.

8. Gerardi, M. H. The Microbiology of Anaerobic Digesters / M. H. Gerardi. – New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2003. – 188 p.

9. Вода. Метод определения химического потребления кислорода: ГОСТ Р 52708–2007. – Введ. 01.07.2008. – М.: Стандартинформ, 2007. – 7 с.

10. Жмур, Н. С. Технологические и биохимические процессы очистки сточных вод на сооружениях с аэротенками / Н. С. Жмур. – М.: АКВАРОС, 2003. – 512 с.

11. Фауна аэротенков: атлас / А. А. Айсаев [и др.]; отв. ред. Л. А. Кутикова. – Л.: Наука: Ленинград. отд-ние, 1984. – 264 с.

12. Жмур, Н. С. Комплект методик по гидрохимическому контролю активного ила: определение массовой концентрации активного ила, илового индекса, зольности сырого осадка, активного ила, прозрачности надиловой воды: ФР 1.31.2008.04397, ФР 1.31.2008.04398, ФР 1.31.2008.04399, ФР 1.31.2008.04400. – М.: АКВАРОС, 2008. – 39 с.

13. Методическое руководство по контролю процесса биологической очистки сточных вод: учеб.-метод. пособие / Р. М. Маркевич [и др.]. – Минск: БГТУ, 2009. – 161 с.

14. Активный ил: база данных / Е. А. Флюрик [и др.] [Электронный ресурс]. – Электрон. дан. (1,3 Гб). – Минск: БГТУ, 2009. – 2 электрон. опт. диска (CD-ROM).

15. Классификация водоемов и биоценозов по сапробности [Электронный ресурс]. – Тольятти, 2003. – Режим доступа: http://www.ievbras.ru/ecostat/Kiril/Library/Book1/Content244/Content244.htm. – Дата доступа: 04.02.2015.

16. Храмцов, А. Г. Технология продуктов из молочной сыворотки / А. Г. Храмцов, П. Г. Нестеренко. – М.: ДеЛи принт, 2003. – 197 с.

17. Соколова, З. С. Технология сыра и продуктов переработки сыворотки: учеб. пособие / З. С. Соколова, Л. И. Лакомова, В. Г. Тиняков. – М.: Агропромиздат, 1992. – 335 с.

18. Кузнецов, И. Н. Комплексная микробиологическая переработка послеспиртовой барды с получением белоксодержащего кормового продукта: дис. … канд. техн. наук: 03.01.06 / И. Н. Кузнецов. – Минск, 2012. – 116 л.

19. Биоэтанол, производство биоэтанола, технология производства биоэтанола [Электронный ресурс]. – Ростов н/Д, 2009. – Режим доступа: http://agrogold.ru/bioetanol,_proizvodstvo_ bioetanola. – Дата доступа: 18.03.2015.

20. Биобутанол: история, технологии, производители [Электронный ресурс]. – М., 2009. – Режим доступа: http://www.abercade.ru/research/analysis/1390.html. – Дата доступа: 18.03.2015.

21. Биодизель [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://ru.wikipedia.org/wiki/Биодизель. – Дата доступа: 25.03.2015.

22. Сушкова, В. И. Безотходная конверсия растительного сырья в биологически активные вещества / В. И. Сушкова, Г. И. Воробьева. – М.: ДеЛи принт, 2008. – 215 с.

23. Круглов, Ю. В. Микробиологические методы оценки экологической опасности применения пестицидов: метод.

рекомендации / Ю. В. Круглов, Л. Н. Пароменская. – М.: ВАСХНИЛ, 1991. – 46 с.

24. Обзор технологии получения биоразлагаемых пластиков [Электронный ресурс]. – Н. Новгород, 2011. – Режим доступа: http://www.simplexnn.ru/?id=8543. – Дата доступа: 14.01.2015.

25. Тасекеев, М. С. Производство биополимеров как один из путей решения проблем экологии и АПК / М. С. Тасекеев, Л. М. Еремеева [Электронный ресурс]. – Алматы, 2009. – Режим доступа: http://bio.sfu-kras.ru/files/2540_Proizvodstvo_biopolimerov.pdf. – Дата доступа: 17.01.2015.

26. Оболенская, А. В. Лабораторные работы по химии древесины и целлюлозы: учеб. пособие / А. В. Оболенская, З. П. Ельницкая, А. А. Леонович. – М.: Экология, 1991. – 320 с.

27. Горбатенко, И. В. Переработка отходов лигноцеллюлозных материалов в гумусосодержащее органоминеральное удобрение: дис. … канд. техн. наук: 05.21.03 / И. В. Горбатенко. – Минск, 1997. – 149 л.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ПРЕДИСЛОВИЕ 3

1. СОВРЕМЕННЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ОЧИСТКИ СТОЧНЫХ ВОД В АЭРОБНЫХ УСЛОВИЯХ 4

1.1. Совершенствование биотехнологий совместного удаления из сточных вод азота и фосфора 4

1.1.1. Ацидофикация сырого осадка с целью увеличения содержания летучих жирных кислот 4

1.1.2. Технологическая схема с биокоагулятором 6

1.1.3. Ступенчатая денитрификация 6

1.1.4. Энергосберегающая технология (с карусельной зоной) 7

1.1.5. Автотрофный процесс Анаммокс 9

1.1.6. Реализация процессов нитри- и денитрификации в одном объеме 9

1.1.7. Использование повышенных доз активного ила 10

1.1.8. Концентрирование биомассы путем комбинации взвешенных и прикрепленных форм микроорганизмов 10

1.1.9. Гибкая адаптивная система расположения блоков очистки 11

1.1.10. Раздельное уплотнение и обезвоживание осадка первичных отстойников и избыточного активного ила 12

1.1.11. Интенсификация ацидофикации в анаэробной зоне 12

1.2. Применение аэробного гранулированного активного ила 13

1.2.1. Преимущества использования аэробного гранулированного активного ила 13

1.2.2. Факторы, влияющие на формирование аэробного гранулированного активного ила 14

1.2.3. Стадии формирования аэробного гранулированного активного ила 15

1.3. Очистка хозяйственно-бытовых сточных вод с использованием реакторов циклического действия 16
1.4. Использование иммобилизации биомассы активного ила в практике очистки сточных вод 25
1.4.1. Преимущества использования биотенков 25
1.4.2. Роль иммобилизованных биосистем в подавлении нитчатого вспухания активного ила 27
1.4.3. Технологические особенности применения носителей на очистных сооружениях 27
1.5. Мембранные методы 29
1.6. Лабораторная работа. Очистка сточных вод в аэробных условиях 35
1.6.1. Определение перманганатной окисляемости 35
1.6.2. Определение БПК 37
1.6.3. Определение растворенного кислорода 39
1.6.4. Определение фосфора фосфатного колориметрическим методом 42
1.6.5. Определение фосфора общего 44
1.6.6. Очистка сточных вод в аэробных условиях 44

2. СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ АНАЭРОБНОЙ ОЧИСТКИ СТОЧНЫХ ВОД 45
2.1. Влияние условий анаэробной очистки сточных вод на выход и состав биогаза 45
2.1.1. Стадии анаэробного процесса 45
2.1.2. Взаимосвязь стадий анаэробного процесса 46
2.1.3. Характеристика метанобразующих бактерий ... 48
2.1.4. Факторы, влияющие на анаэробный процесс очистки сточных вод 49
2.2. Лабораторная работа. Очистка сточных вод в анаэробных условиях 60
2.2.1. Установление ХПК окислением бихроматом в кислой среде 60
2.2.2. Установление концентрации аммонийного азота 65
2.2.3. Установление концентрации взвешенных веществ 67
2.2.4. Очистка сточных вод в анаэробных условиях 68
2.2.5. Определение концентрации летучих органических кислот в биологически очищенной воде 69

2.2.6. Щелочность 70
2.2.7. Определение окислительно-восстановительного потенциала (ОВП) 72

3. СОСТАВ И СВОЙСТВА АКТИВНОГО ИЛА 73
3.1. Трофические взаимоотношения в биоценозе активного ила 74
3.2. Отклик биоценоза активного ила на внешнее воздействие 76
3.3. Уровень развития биоценоза и его деструкционный потенциал 78
3.4. Структура и свойства хлопков активного ила 81
3.5. Признаки ухудшения экологических условий функционирования активного ила 83
3.6. Использование системы сапробности для характеристики качества очистки сточных вод 85
3.6.1. Оценка качества очищенной воды по составу индикаторных организмов 86
3.6.2. Оценка состояния биоценоза по видовой структуре 89
3.7. Лабораторная работа. Гидробиологический анализ активного ила 91
3.7.1. Визуальное исследование ила 92
3.7.2. Определение илового индекса 94
3.7.3. Определение состояния хлопка активного ила 96
3.7.4. Определение видового состава биоценоза активного ила 97
3.7.5. Определение численности организмов различных видов 100
3.7.6. Оценка физиологического состояния организмов активного ила 103
3.7.7. Определение размеров организмов 105
3.7.8. Классификация организмов активного ила по индикаторным группам 106
3.7.9. Определение типа биоценоза и его характерных особенностей 106

4. БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ ПЕРЕРАБОТКА ПРОМЫШЛЕННЫХ ОТХОДОВ 108
4.1. Направления переработки молочной сыворотки 108
4.1.1. Состав молочной сыворотки 108

4.1.2. Использование молочной сыворотки в Республике Беларусь 109
4.1.3. Использование сыворотки в натуральном виде 110
4.1.4. Переработка и применение сыворотки в виде концентратов 111
4.1.5. Выделение и использование наиболее ценных компонентов сыворотки 111
4.1.6. Биотехнологическая переработка сыворотки 113
4.2. Лабораторная работа. Переработка молочной сыворотки с получением белкового концентрата и этанола 116
4.2.1. Подготовка молочной сыворотки к биохимической переработке 116
4.2.2. Установление содержания углеводов 117
4.2.3. Подготовка посевного материала 117
4.2.4. Сбраживание углеводов сыворотки в этанол 117
4.2.5. Анализ бражки на содержание этанола 117
4.3. Сравнительная оценка направлений переработки послеспиртовой барды 118
4.3.1. Состав послеспиртовой барды 118
4.3.2. Использование послеспиртовой барды в Республике Беларусь 119
4.3.3. Использование послеспиртовой барды в мировой практике 119
4.4. Лабораторная работа. Анаэробная переработка послеспиртовой барды с получением кормового препарата витамина B_{12} 127
4.4.1. Подготовка и анаэробная переработка послеспиртовой барды 127
4.4.2. Установление количественного содержания витамина B_{12} в бражке спектрофотометрическим методом 128
4.5. Лабораторная работа. Обогащение послеспиртовой барды микробным белком 129
4.5.1. Подготовка посевного материала 130
4.5.2. Подготовка послеспиртовой барды к выращиванию дрожжей 130
4.5.3. Ультразвуковая обработка послеспиртовой барды 131
4.5.4. Выращивание дрожжей на подготовленной послеспиртовой барде 131
4.5.5. Расчет эффективности использования компонентов послеспиртовой барды продуцентом белка 132

5. БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ ПЕРЕРАБОТКА РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ 133
5.1. Получение биотоплива 133
5.1.1. Производство биоэтанола 133
5.1.2. Производство биобутанола 135
5.1.3. Производство биодизеля 139
5.2. Получение кормового белка на растительных отходах 141
5.2.1. Сырье для получения кормового белка 142
5.2.2. Подготовка растительного сырья к биоконверсии 144
5.2.3. Выбор микроорганизмов – продуцентов белка 147
5.2.4. Подготовка посевного материала 150
5.2.5. Выбор способа культивирования 150
5.2.6. Режимы культивирования 153
5.2.7. Продукты микробной конверсии 154
5.3. Лабораторная работа. Получение кормового белка на растительных отходах 156
5.3.1. Приготовление посевного материала на агаризованной среде 156
5.3.2. Приготовление питательных сред 157
5.3.3. Выращивание дрожжей в качалочных колбах 158
5.3.4. Выделение биомассы из культуральной жидкости 158
5.3.5. Определение концентрации биомассы дрожжей в культуральной жидкости 159
5.3.6. Определение содержания редуцирующих веществ в гидролизате и отработанной культуральной жидкости 159
5.3.7. Расчет экономического коэффициента 162
5.3.8. Определение содержания истинного протеина в биомассе дрожжей по Барнштейну 162
5.4. Лабораторная работа. Обогащение белком целлюлозосодержащих отходов 165
5.4.1. Приготовление питательных сред 165
5.4.2. Приготовление посевного материала на агаризованной среде 165
5.4.3. Получение посевного материала в качалочных колбах 166
5.4.4. Твердофазная ферментация целлюлозосодержащих отходов 166
5.4.5. Установление потери массы субстрата после ферментации 167

5.4.6. Определение содержания белка по методу Брэдфорда 167
5.4.7. Определение содержания белка по методу Варбурга и Христиана 169
5.4.8. Расчет продуктивности культуры 170

6. ОЦЕНКА ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ ОПАСНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ПЕСТИЦИДОВ 171
6.1. Характеристика и классификация пестицидов. Почвенно-микробиологическая оценка результатов применения пестицидов 171
6.1.1. Характеристика и классификация пестицидов 171
6.1.2. Почвенно-микробиологическая оценка результатов применения пестицидов 176
6.2. Лабораторная работа. Оценка экологической опасности применения пестицидов 179
6.2.1. Подготовка почвы к проведению почвенно-микробиологической оценки результатов применения пестицидов 179
6.2.2. Определение влажности и полной влагоемкости почвы 180
6.2.3. Установление показателей биохимической активности почвы, подвергавшейся воздействию пестицидов 181
6.2.4. Установление интенсивности нитрификации в почве, подвергавшейся воздействию пестицидов 183

7. БИОРАЗЛАГАЕМЫЕ ПОЛИМЕРНЫЕ МАТЕРИАЛЫ 185
7.1. Экологическая опасность синтетических полимеров 185
7.2. Получение биоразлагаемых полимеров 186
7.2.1. Использование полиэфиров гидроксикарбоновых кислот 187
7.2.2. Получение пластических масс на основе воспроизводимого природного сырья 190
7.2.3. Придание промышленным полимерным материалам способности к биодеградации 192
7.3. Методы оценки биоразлагаемости полимеров 195
7.4. Лабораторная работа. Определение степени деструкции растительных отходов и пластмасс в условиях компостирования 197

7.4.1. Подготовка растительных отходов и пластмасс к компостированию 197
7.4.2. Компостирование растительных отходов и пластмасс 201
7.4.3. Установление степени деструкции растительных отходов и пластмасс 201
7.4.4. Установление содержания в компосте гумусовых веществ 203

ПРИЛОЖЕНИЕ А 205

ПРИЛОЖЕНИЕ Б 206

ЛИТЕРАТУРА 208

Учебное издание

Маркевич Раиса Михайловна
Гребенчикова Ирина Александровна
Рымовская Мария Васильевна

ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ

ЛАБОРАТОРНЫЙ ПРАКТИКУМ

Учебно-методическое пособие

Редактор *Е. С. Ватеичкина*
Компьютерная верстка *С. С. Белявская*
Корректор *Е. С. Ватеичкина*

Подписано в печать 09.11.2015. Формат $60\times84^{1}/_{16}$.
Бумага офсетная. Гарнитура Таймс. Печать офсетная.
Усл. печ. л. 12,7. Уч.-изд. л. 13,1.
Тираж 40 экз. Заказ .

Издатель и полиграфическое исполнение:
УО «Белорусский государственный технологический университет».
Свидетельство о государственной регистрации издателя,
изготовителя, распространителя печатных изданий
№ 1/227 от 20.03.2014.
Ул. Свердлова, 13а, 220006, г. Минск.