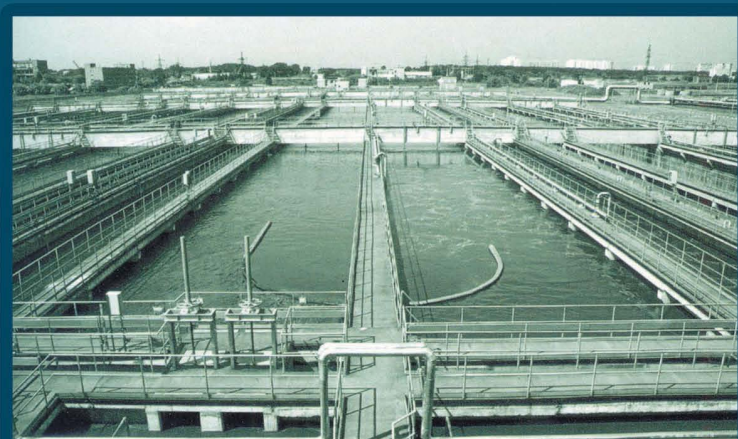


Ю.В. Воронов В.Н. Журов

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОКИСЛИТЕЛИ



Ю.В. Воронов, В.Н. Журов

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОКИСЛИТЕЛИ



МГСУ
Издательство Ассоциации строительных вузов
Москва
2009

Рецензенты: зав. сектором «Очистка сточных вод» докт. техн. наук *Н.А. Залетова*;
ген. директор ООО «ГЛАКОМПУ – проектирование»
канд. техн. наук *А.С. Комаров*.

Воронов Ю.В., Журов В.Н.

Биологические окислители: Научное издание. – М.:

Издательство Ассоциации строительных вузов, 2009. – 104 с.

ISBN 978-5-93093-660-5

В монографии рассмотрены основные закономерности микробиальной трансформации органических соединений и приведены наиболее рациональные технологические схемы использования биологических окислителей как аэрационного, так и фильтрационного типов применительно к очистке сточных вод.

Предназначена для специалистов, работающих в области проектирования и эксплуатации водоотводящих систем и сооружений, а также охраны окружающей природной среды. Может быть использована также для студентов вузов, обучающихся по специальности «Водоснабжение и водоотведение (270112)».

Рекомендовано Научно-техническим советом МГСУ

ISBN 978-5-93093-660-5

© Воронов Ю.В., Журов В.Н., 2009

© МГСУ, 2009

© Оформление. Издательство АСВ, 2009

ВВЕДЕНИЕ

Микробная трансформация органических соединений лежит в основе микробиологических и биотехнологических процессов, широко используемых в различных отраслях промышленности (пищевая, фармацевтическая и др.), сельского хозяйства, в области охраны окружающей среды. Культуры микроорганизмов, в том числе и специально селекционированные, используют для целенаправленного получения различных продуктов. К наиболее распространенным группам микроорганизмов относятся грибы (дрожжи и плесени и др.), актиномицеты (образуют подобие мицелия), а также бактерии.

Питательный субстрат, или питательная среда, для них является сложной трехфазной системой, содержащей жидкие, твердые и газообразные компоненты. Углеродосодержащее сырье является основным для проведения микробиологического синтеза. Наиболее широко применяемыми в производственных условиях источниками углерода являются кристаллическая глюкоза, технические сахароза и лактоза, уксусная кислота, крахмал, синтетический этиловый спирт и др. В принципе любое органическое сырье может быть ассимилировано микроорганизмами. Однако, за исключением лишь немногих органических соединений, оно мало пригодно для микробного синтеза без предварительной химической или ферментативной обработки. В этой связи технологические схемы получения того или иного продукта носят многоступенчатый характер подготовки и переработки сырья.

Помимо выбора культуры микроорганизмов, соответствующей получению целевого продукта, технологическая схема предусматривает создание и поддержание оптимальных условий для эффективного функционирования этой культуры. Биотехнология здесь тесно связана с биоинженерией, в задачи которой входит создание биореакторов, аэрирующих устройств, оборудования для стерилизации питательных сред, воздуха и проч. Как правило, технологические схемы трансформации органических соединений включают биоокислители различных конструкций и принципов функционирования. Так, в области очистки сточных вод самое широкое распространение получили биоокислители аэрационного, фильтрационного и смешанного типов. В сточной воде практически всегда присутствуют органические вещества, которые подразделяют на три группы: глюкоиды (сахара, целлюлоза), липиды (масла, жиры, мыла) и протеины. По своей природе они могут быть охарактеризованы как «троичные» (сахара, жиры), содержащие углерод, кислород, водород или как «четвертичные», содержащие кроме трех названных элементов еще и азот (протеины). Наиболее труднодоступными для окисления микробиальным путем являются «четвертичные» соединения.

Окислители аэрационного типа характерны тем, что биомасса, осуществляющая изъятие и окисление растворенных органических соединений, называемая активным илом, находится во взвешенном в очищаемой воде состоянии в аэрационной емкости. В эту емкость подается воздух для обеспечения

иловой смеси кислородом и равномерного распределения биомассы по всему объему емкости. В процессе контакта определенной длительности активного ила с органическими загрязнениями происходят изъятие и диссимилиция такими организмами органических соединений. Микроорганизмы, потребляя в качестве питания растворенные органические вещества, превращают их в биомассу, легко отделимую от очищенной воды либо путем отстаивания, либо флотацией, либо фильтрацией. К биоокислителям этого типа относятся аэротенки различных конструкций и схем функционирования, биологические пруды. В отличие от аэротенков в биоокислители может подаваться технический кислород, в связи с чем они получили название окситенков.

Окислители фильтрационного типа функционируют по принципу изъятия и диссимилиции растворенных органических веществ, фиксированной на твердом носителе биомассой, покрывающей в виде биологической пленки поверхность носителя. Из омывающей биопленку воды микроорганизмы извлекают и трансформируют растворенные органические вещества в биомассу, отделяемую от очищенной воды практически теми же методами, что и в аэрационных окислителях.

Выращенная в биоокислителях на растворенных органических веществах биомасса после отделения от очищенной воды, а если необходимо, то после сгущения и уплотнения, может быть подвергнута дальнейшей микробной трансформации либо в аэробных, либо в анаэробных условиях. В аэробных условиях этот этап обработки проводится в аэробных стабилизаторах ила. В анаэробных условиях обработка осуществляется в сооружениях типа метантенков с получением биогаза, т. е. с превращением твердых органических веществ в газообразные продукты.

Авторы благодарят доктора технических наук Н.А. Залетову и кандидата технических наук А.С. Комарова за замечания и полезные советы, сделанные при рецензировании рукописи книги.

Глава 1. ОСНОВНЫЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ МИКРОБИАЛЬНОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

1.1. Особенности микробной трансформации органических соединений

Биотехнологические процессы основываются на функционировании либо микробных клеток, либо изолированных из них биологических структур, чаще всего – ферментов. К наиболее распространенным в природе и широко используемым в микробиологической промышленности группам относятся микроскопические грибы (дрожжи и плесени), актиномицеты (образуют подобие мицелия), а также бактерии. Размеры их клеток обычно 0,5–10 мкм.

Вся жизнедеятельность клетки протекает при участии ферментов, и большинство белков клеток представлено именно в виде ферментов (в любой микробной клетке их 1000–2000). Одни ферменты, относящиеся к экзоферментам (амилазы, целлюлазы и др.), подготавливают субстрат для его проникновения в клетку, другие ферменты – пермеазы участвуют в процессах транспорта вещества через клеточные мембраны, третьи – катализируют процесс генерирования энергии, биосинтез макромолекул и т.д. При этом в клетке одновременно и постоянно протекают два процесса – распад молекул (катаболизм) и синтез новых клеток (анаболизм), составляющие в целом процесс обмена веществ – метаболизм. Для поддержания процесса обмена веществ клетка нуждается во внешнем источнике энергии, поскольку процессы синтеза требуют расхода энергии. Процессы активного транспорта в клетку, движение, деление также требуют энергии. Источником энергии для клетки являются богатые энергией питательные вещества.

Важнейшими субстратами для осуществления дыхания и большинства видов брожения служат углеводы. Кроме того, при дыхании могут использоваться также белки и жиры, а при брожении – спирты и органические кислоты. Из-за малого выхода энергии клетки, осуществляющие брожение, должны расходовать большие количества субстрата, чем клетки, осуществляющие дыхание.

У большинства микроорганизмов расщепление органических веществ происходит в присутствии кислорода – аэробный обмен. В результате такого обмена остаются бедные энергией конечные продукты (CO_2 и H_2O), но высвобождается много энергии.

Высвобождающаяся в процессах аэробного (и анаэробного) расщепления веществ энергия аккумулируется и передается с помощью высокоэнергичных соединений типа АТФ – аденозинтрифосфорной кислоты.

Микроорганизмы, применяемые в микробиологической промышленности, принадлежат к разным таксономическим группам (бактерии, сумчатые грибы, фикомицеты, актиномицеты и др.) и существенно отличаются друг от друга по морфологии, размерам клеток, отношению к кислороду, по потребно-

стям к ростовым факторам, по способности ассимилировать разные компоненты субстрата и т.д.

Из более чем 100 тыс. известных видов микроорганизмов в промышленности используют относительно мало – около 100 видов, к которым принадлежат несколько тысяч штаммов. В промышленности применяют три вида штаммов: природные штаммы, нередко улучшенные естественным или искусственным путем, штаммы, измененные в результате индуцированных мутаций, и штаммы культуры, полученные методом генной или клеточной инженерии.

Углеводосодержащее сырье является основным сырьем микробного синтеза. Наиболее широко применяемыми в производственных условиях источниками углерода являются кукурузный крахмал, глюкоза, сахароза-сырец, уксусная кислота, метанол, этанол и т.д. Большинство микроорганизмов хорошо ассимилирует углеводы. При катаболизме большое значение имеют строение углеродного скелета молекул (прямой, разветвленный или циклический) и степень окисления углеродных атомов. Легкодоступными являются сахара, особенно гексозы, за ними следуют многоатомные спирты (глицерин, маннит и др.) и карбоновые кислоты.

Питательный субстрат для микробной массы является сложной трехфазной системой, содержащей жидкие, твердые и газообразные компоненты. Механизм изъятия и окисления органических веществ из него, определяющий как скорость, так и эффективность метаболических процессов, весьма сложен и до сих пор многие его аспекты недостаточно ясны. Принятая ранее модель процесса изъятия этих веществ представлялась в виде трехэтапной схемы, в которой первый этап – поступление органических веществ из жидкости к поверхности клетки и, как следствие, сорбция его на поверхности клетки; второй – диффузия через мембраны клетки либо самого вещества, либо продуктов гидролиза этого вещества, способных проникать внутрь клетки; третий – внутриклеточный метаболизм этих продуктов с выделением энергии и синтезом нового клеточного вещества. При этом считалось, что протекание процесса на первом этапе определяется законами диффузии того или иного вещества в жидкости и, следовательно, гидродинамическими условиями в аэрационном аппарате. Поскольку суммарная поверхность микроорганизмов может достигать 100 м^2 на 1 г сухого вещества биомассы, то только постоянное и эффективное перемешивание содержимого аэрационного аппарата создает оптимальные условия для равномерного подведения питательных веществ и кислорода (в аэробных условиях) к поверхности клеток микроорганизмов, обеспечивая этим постоянство и непрерывность биохимических процессов.

Перенос вещества на втором этапе, т.е. от поверхности клетки внутрь ее, рассматривался как протекающий либо путем присоединения проникающего вещества к специфическому белку – переносчику, находящемуся в мембране клетки и вводящему это вещество внутрь ее, после чего белок высвобождается для совершения нового «захвата» вводимого вещества и нового цикла переноса, либо путем непосредственного растворения этого вещества в веществе

стенки и цитоплазматической мембраны, благодаря чему оно и диффундирует внутрь клетки. И якобы только на третьем этапе имеют место метаболические превращения органических веществ частично в такие конечные продукты, как вода, диоксид углерода, сульфиты, нитраты (процесс окисления органических веществ), частично в новые микробиальные клетки (процесс синтеза биомассы).

Согласно этой модели до начала процесса переноса вещества или продуктов его гидролиза внутрь клетки вещество непременно должно попасть на ее поверхность, т.е. должен пройти процесс сорбции. Такое течение процесса подтверждалось, по мнению некоторых исследователей, тем, что, например, первичное включение меченого углерода C_{14} из субстрата в клетки происходит практически мгновенно (за 1–2 мин) независимо от того, адаптирована или не адаптирована культура микроорганизмов к этому субстрату. Стадия же потребления вещества начинается после некоторого «периода равновесия вещества» между раствором и клетками длительностью от 5–10 мин для адаптированной культуры до нескольких часов для неадаптированной. Период равновесия объяснялся протеканием гидролиза и диффузионным перемещением вещества через клеточную оболочку до цитоплазматической мембраны, где сосредоточены различные ферменты, в том числе и дыхательной цепи. Начало дыхательных реакций якобы нарушает сорбционное равновесие и создает соответствующий сорбционный градиент, обеспечивающий непрерывность дальнейшего поступления субстрата в клетку.

Эта модель была одной из первых попыток объяснения процесса транслокации субстрата через биомембраны посредством «подвижного» переносчика. В ней предполагалось присутствие интегрального мембранного белкового компонента, способного к образованию гидрофобного комплекса с гидрофильным субстратом, экранирующим последний от гидрофобной внутримембранной среды. Образовавшийся комплекс путем диффузии через поры во внешней поверхности мембраны поступает на внутреннюю ее сторону, где субстрат освобождается во внутриклеточное пространство, а переносчик возвращается для нового «захвата» субстрата.

В современной интерпретации механизма транспорта субстрата через клеточную мембрану термин «переносчик» по-прежнему употребляется, хотя все чаще заменяется термином «пермеаза», который учитывает генетическую основу кодирования интегрального мембранного компонента, предназначенного для транслокации субстрата. Возникли и альтернативные модели транслокации субстрата через клеточную мембрану. Так, одна из них предполагает наличие в мембране гидрофильного «канала», через который внутрь клетки могут проникать гидрофильные субстраты. Однако в отличие от малоспецифичного канала, образуемого во внешней мембране в описанной выше модели, здесь предполагается стереоспецифичность транслокации, достигаемая, вероятно, за счет «эстафетной» передачи молекул субстрата от одной функциональной группы к другой, причем субстрат, как ключ, открывает соответствующий для его проникновения канал (модель трансмембранного канала). Вторая альтерна-

тивная модель может рассматриваться как комбинация первых двух с использованием их положительных сторон, поскольку в ней предполагается наличие гидрофобного мембранного переносчика, который путем последовательных конформационных изменений, вызываемых субстратом, проводит последний с внешней на внутреннюю сторону мембраны (модель конформационной транслокации), где гидрофобный комплекс и распадается (рис. 1.1).

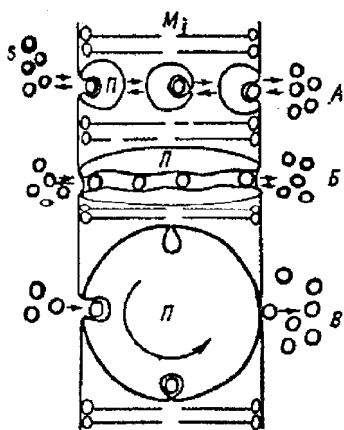


Рис. 1.1. Основные модели опосредованного транспорта субстратов:

- А – «подвижный» переносчик;
- Б – трансмембранный канал;
- В – конформационная транслокация:
- М – мембрана, П – переносчик,
- С – субстрат

При этом установлено, что в состав мембранных транспортных систем часто входит более одного белкового посредника, между которыми может существовать разделение функций: так, в транспорте субстрата могут участвовать «связывающие» белки, роль которых заключается в идентификации субстрата в среде, концентрировании его на внешней поверхности мембраны и последующей передаче его компоненту, осуществляющему транслокацию субстрата через мембрану. Выделены белки, участвующие в «узнавании», связывании и транспорте ряда аминокислот, сахаров, карбоновых кислот и неорганических ионов в клетки бактерий, грибов, животных. При этом в отличие от ферментов (хотя в большинстве своем белковые посредники и есть ферменты) переносчики многих субстратов через биологические мембраны не катализируют каких-либо химических превращений, а лишь обуславливают идентификацию и транслокацию субстратов.

Процесс «активного» транспорта приводит к повышению содержания питательных веществ в клетке против их содержания в окружающей среде, т.е. против градиента их концентрации, и указывает на ферментативный, а не сорбционный характер изъятия питательных веществ из раствора. Этот процесс требует сопряжения процесса транслокации субстрата внутрь клетки с процессом метаболического высвобождения энергии, заключенной в субстрате, протекающим внутри клетки. Эта энергия используется либо на химическую мо-

дификацию субстрата в процессе транслокации, либо на модификацию переносчика в зависимости от структуры транспортных систем клетки, которая, в свою очередь, зависит от характера источника энергии.

Химическая модификация субстрата в процессе транслокации делает его неспособным ни взаимодействовать с переносчиком, ни проникать через мембрану диффузионным путем в обратном направлении, и, следовательно, продукт модификации накапливается в клетке. Из этого следует, что транспорт вещества в клетку связан с самыми первыми этапами именно метаболизма, т.е. с момента контакта клетки с субстратом.

Для модификации переносчика, которая делает невозможным или затрудняет процесс обратной транслокации субстрата из клетки, источником энергии для транспортных систем, содержащих связующие белки, может служить аденозинтрифосфат (АТФ) или родственный ему макроэрг. Такие системы активного транспорта с использованием энергии, освобождающейся при гидролизе АТФ (или родственного макроэрга), для переноса субстратов через клеточную мембрану против градиента их концентрации и их накопления в клетке широко распространены в животных, растительных и бактериальных клетках.

Функции АТФ – зависимых систем транспорта у ряда микроорганизмов состоят непосредственно в активном транспорте и аккумуляции в клетках тех или иных субстратов. Так, *Escherichia coli* способна концентрировать АТФ – зависимой системой ионы K^+ в клетке до 0,1 М даже при очень низком их содержании в среде (менее 10^{-4} М). Достаточно общим правилом для таких систем является корреляция между участием в транспортном процессе связующих белков и использованием источника энергии – АТФ или другого макроэрга. Такие системы получили название «чувствительных к осмотическому шоку». У *Escherichia coli* по такому пути осуществляется транспорт в клетку ряда углеводов (арабинозы, мальтозы, рибозы, ксилозы, β -метил-галактозы), а также аминокислот (аргинина, метионина, гистидина, глутамина, орнитина, диаминопимелиновой кислоты).

Однако чаще эти системы используются как первичный активный транспорт для создания начального градиента неорганических катионов, H^+ , Na^+ и других, который затем служит источником энергии для различных, в том числе и транспортных, целей клетки, т.е. для запуска, системы «вторичного» активного транспорта. При этом возникает трансмембранный электрохимический потенциал (ТЭП), или «протондвижущая сила», величина которой определяется уравнением

$$\Delta MN^+ = F \Delta \Phi - 2,3 RT \Delta pN, \quad (1.1)$$

где ΔMN^+ – ТЭП; F – постоянная Фарадея; $\Delta \Phi$ – электрический трансмембранный потенциал; $F \Delta \Phi$ – электрическая составляющая ТЭП; R – газовая постоянная; T – абсолютная температура; ΔpN – концентрационная составляющая ТЭП.

Энергия, запасенная в ТЭП, может, как было отмечено выше, использоваться как для синтеза АТФ, так и непосредственно на нужды клетки, в том числе транспортные. При формировании ТЭП внутри клетки создается избыток отрицательных зарядов, что приводит к движению положительно заряженных молекул субстрата или их компонентов с переносчиками по градиенту электрической составляющей ТЭП, которые проникают через мембрану путем электрофореза. В случае же отрицательно заряженных молекул субстрата для их проникновения через мембрану в клетку требуется их обмен на эквивалентное количество внутриклеточных анионов или перенос молекул субстрата в клетку совместно с внеклеточными катионами H^+ или Na^+ по концентрационной составляющей ТЭП (ΔpH или ΔpNa). Транспортные системы, зависящие от ТЭП, не содержат, как правило, связующих белков и сохраняют активность в субклеточных мембранных системах (липосомах и везикулах), что дало им название «мембраносвязанных систем». Так, установлено, что у *Escherichia coli* и ряда других микроорганизмов по этому пути осуществляется транспорт лактозы и дикарбоновых кислот с ионами H^+ и глутамата и мелибиозы с катионами Na^+ .

В свете современных представлений ферментативной кинетики весь цикл взаимоотношений микробной клетки с окружающей средой в процессе трансформации органических соединений определяется и регулируется соответствующими ферментами. Значительная часть продуктов этой трансформации может экскретироваться из клеток в культуральную жидкость и накапливаться в среде. Некоторые промежуточные метаболиты служат резервным питательным фондом, которым клетка пользуется после истощения основного источника питания. Все это означает, что химический состав и физико-химические свойства среды постоянно меняются в результате ферментативной деятельности клеток, что дает основание рассматривать ферментируемый субстрат как продолжение внутренней среды клетки.

По характеру катализируемых ими реакций ферменты делят на шесть основных классов, приведенных в *табл. 1.1*.

Ферменты синтезируются, как все белки, на рибосомах и локализуются в цитоплазме и в различных субструктурах, встроенных в мембраны, находятся на поверхности клетки или в окружающей клетку среде. Общее содержание ферментов в клетке может достигать 40–60% от содержания белка, а содержание каждого фермента в ней может составлять около 100 тыс. молекул или от 0,1 до 5% от количества белка.

Выделяемые в культуральную среду ферменты в основном принадлежат к гидролазам (амилазы, протеазы, целлюлазы и др.), расщепляющим белки, крахмал, целлюлозу и другие нерастворимые в воде вещества и подготавливающим субстрат для его проникновения в клетку. Другие ферменты – пермеазы – участвуют в процессах транспорта вещества через клеточные мембраны внутрь клетки, третьи – катализируют процессы генерирования энергии, биосинтез макромолекул и т.д. Свойством многих ферментов микробного происхождения является их индуцибельность. Так, синтез В-галактозидазы у

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|---|------------|
| Введение | 3 |
| Глава 1. Основные закономерности микробиальной трансформации органических соединений | 5 |
| 1.1. Особенности микробиальной трансформации органических соединений | 5 |
| 1.2. Роль кислорода в процессах микробиальной трансформации органических соединений | 25 |
| Глава 2. Биологические окислители аэрационного типа – аэротенки | 41 |
| 2.1. Принципы очистки сточных вод активным илом в аэротенках | 41 |
| 2.2. Технологические схемы работы аэротенков | 44 |
| Глава 3. Биологические окислители фильтрационного типа – биофильтры | 64 |
| 3.1. Теоретические основы метода биофильтрации | 64 |
| 3.2. Технологические схемы работы биофильтров | 71 |
| 3.3. Системы, обеспечивающие устойчивую и надежную работу биофильтров | 73 |
| 3.4. Принципы расчета, проектирования и конструирования биофильтров | 78 |
| 3.5. Комбинированные сооружения и методы интенсификации работы биоокислителей | 86 |
| Библиографический список | 102 |

Научное издание

Юрий Викторович **Воронов**
Владимир Никифорович **Журов**

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОКИСЛИТЕЛИ

Компьютерная верстка: *Е.М. Лютова*
Дизайн обложки: *Н.С. Романова*
Редактор: *В.Ш. Мерзлякова*

Лицензия ЛР № 0716188 от 01.04.98. Формат 70x100/16.
Бумага офс. Гарнитура Таймс. Печать офсетная.

Усл. 6,5 п.л. Тираж 500 экз. Заказ №

Издательство Ассоциации строительных вузов (АСВ)
129337 Москва, Ярославское шоссе, 26, отдел реализации – оф. 348 (КМК)
тел., факс: (499) 183-56-83, e-mail: iasv@mgsu.ru, <http://www.iasv.ru/>