



На правах рукописи

**КУЗНЕЦОВ**

**Александр Евгеньевич**

**ВЫСОКОЭФФЕКТИВНЫЕ ЭКОЛОГИЧЕСКИ ЧИСТЫЕ  
СОВМЕЩЕННЫЕ СИСТЕМЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО СИНТЕЗА  
И ОЧИСТКИ СТОЧНЫХ ВОД С ОКСИДАТИВНЫМ СТРЕССОВЫМ  
ВОЗДЕЙСТВИЕМ**

03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
доктора технических наук

Москва – 2020

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Российский химико-технологический университет имени Д. И. Менделеева».

**Официальные оппоненты:**

**Нетрусов Александр Иванович,**

доктор биологических наук, профессор кафедры микробиологии биологического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова

**Сироткин Александр Семенович,**

доктор технических наук, профессор, зав. кафедрой промышленной биотехнологии ФГБОУ ВО «Казанский национальный исследовательский технологический университет»

**Дворецкий Дмитрий Станиславович,**

доктор технических наук, профессор, зав. кафедрой технологии и оборудования пищевых и химических производств ФГБОУ ВО «Тамбовский государственный технический университет»

Ведущая организация: Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет), (СПбГТИ(ТУ)), г. Санкт-Петербург

Защита диссертации состоится «30» марта 2021 года в 11 часов 00 минут на заседании диссертационного совета Д 999.095.03 при РХТУ имени Д. И. Менделеева (125047, г. Москва, Миусская пл., 9) в конференц-зале (ауд. 443).

С диссертацией можно ознакомиться в информационно-библиотечном центре РХТУ им. Д.И. Менделеева, а также на официальном сайте <http://diss.muctr.ru/>

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2021 г.

Отзывы на автореферат (в 2-х экземплярах), заверенные печатью организации, просим направлять по вышеуказанному адресу ученому секретарю совета.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
Д 999.095.03, к.т.н.

 И.В. Шакир

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность.** Организация объединенных наций по промышленному развитию (ЮНИДО) определяет экологически чистое производство (Cleaner Production) как систему **превентивных мер**, с помощью которых проблема отходов и загрязнений решается у источника их образования, в начале, а не в конце «трубы». В частности, применительно к микробиологическому синтезу и биологической очистке сточных вод это означает ведение процесса со сбережением сырья и энергии, минимальным образованием вторичных отходов при сохранении высоких показателей очистки по производительности, выходу целевого продукта, эффективности удаления загрязнений из сточных вод.

Анализ вариантов применения методологии экологически чистого производства в отношении микробиологического синтеза, биодеструкции и биологической очистки позволил акцентировать внимание на таких решениях, которые воспроизводят или моделируют процессы, протекающие в природных средах. Подробно наиболее важные особенности природных процессов, с акцентом на участие микроорганизмов, были рассмотрены нами ранее<sup>1</sup>. Их характерные черты:

1) **Сочетание по месту и времени абиотических и биотических процессов** трансформации веществ в единой экологической нише. Анализ литературы показал отсутствие системных исследований в разработке таких **совмещенных (сопряженных, гибридных)** процессов.

2) Протекание **самоочищения** в природных средах при совместном, во многом одновременном действии биоты, химически-активных частиц, активных форм кислорода – АФК ( $H_2O_2$  и др.), особенно важных для устойчивого функционирования замкнутых экосистем.

3) Нахождение большей части организмов популяции или их сообществ в неоптимальных условиях, в состоянии, характеризуемом как **стресс**.

Целенаправленная и контролируемая реализация комплекса этих условий и процессов в единой биотехнологической системе означает переход от методов управляемого культивирования к методам **управляемой экологической ниши**, в которой для микроорганизмов воспроизводится естественная среда обитания, моделируются природные экосистемы, круговороты веществ и их перенос по трофическим цепям. Примером такой экологической ниши являются освещаемые Солнцем твердые и водные поверхности, где активно развивается микробиота и протекают реакции с участием АФК, ультрафиолета, ионов переходных металлов, других абиотических факторов.

**Цель исследований** – обоснование и разработка научных основ совершенствования микробиологических процессов культивирования с учетом приоритетов экологически чистого производства и воспроизведения совмещенных процессов при построении биотехногенных экосистем по принципам функционирования природных экосистем.

В соответствии с поставленной целью решались следующие **задачи**:

– научно-методологическое обоснование совершенствования микробиологических процессов культивирования с учетом приоритетов экологически чистого производства;

– исследование способов минимизации вторичных отходов при проведении процессов биосинтеза и биодеструкции, в частности, в периодическом режиме без подпитки и с подпиткой высококонцентрированным субстратом, непрерывном хеостатном, режиме с полным рециклом активного ила, в мембранном биореакторе, ферментации с адсорбцией;

– исследование процессов автоселекции микроорганизмов при одновременном протекании химических и фотохимических окислительных процессов, подбор условий совместимости химических, фотохимических и биологических процессов в едином пространстве и во времени;

– исследование гибридных химических и микробиологических, фотохимических и микробиологических систем культивирования и биологической очистки, сочетающих в едином пространстве и во времени физико-химические, химические, фотохимические и биологические процессы, процессы самоочищения и экспериментальная оценка возможностей предложенных систем, выбор наиболее перспективных вариантов;

<sup>1</sup>Кузнецов А.Е., Градова Н.Б. Научные основы экобиотехнологии. – М. Мир, 2006. – 504 с.

– исследование процессов ферментации и биологической очистки в условиях стресса, в первую очередь оксидативного, обусловленного действием активных форм кислорода, их участием в регулировании биохимических процессов, физиологического состояния микроорганизмов.

#### **Научная новизна.**

Впервые системно рассмотрены методы микробиологического культивирования, переработки отходов и очистки сточных вод с совмещением по месту и времени микробиологических и абиотических процессов (с участием физико-химических, химических, фотохимических, стрессорных и антистрессорных факторов) и показана их перспективность для создания более экологически эффективных, малоотходных, высокопроизводительных, экономичных биотехнологий.

Научно обоснованы пути совершенствования традиционных и создания микробиологических систем культивирования нового поколения с использованием совмещенных процессов, средств, которые подавляют абиотические реакции, протекающие в ходе ферментации, и тем самым устраняют неблагоприятное воздействие продуктов фотохимических и химических реакций на клетки микроорганизмов или, напротив, индуцируют у микроорганизмов системы ответа на оксидативный стресс.

Показано, что комбинированное действие активных форм кислорода ( $H_2O_2$ , анолита электрохимического разложения, ультрафиолета А или В диапазонов спектра) и видимого света может выступать в качестве инструмента для управления ростом гетеротрофных микроорганизмов, находящихся в состоянии стресса, изначально не чувствительных в обычных условиях (без воздействия АФК) к освещению.

Впервые показано, что контролирование и использование факторов оксидативного стресса и антистрессорных, протекторных факторов в определенных условиях улучшает ростовые и биосинтетические характеристики культивируемых микроорганизмов: повышает выход и уровень накопления целевого продукта, удельную скорость роста, долю жизнеспособных клеток, бродильную активность, устойчивость их к оксидативному воздействию, субстратному голоданию, закислению среды, к осмотическому стрессу и к токсичным веществам, другим стрессорным воздействиям, способствует длительному поддержанию высокой физиологической активности микроорганизмов и продуктивности биореактора в высокоплотностной культуре, снижает остаточные концентрации субстратов, а в процессах биологической переработки отходов и очистки сточных вод – повышает биодоступность субстратов, устойчивость микроорганизмов к загрязнениям, качество очистки, физиологическую и биохимическую активность микроорганизмов в составе активных илов, биопленок и гранул, улучшает седиментационные свойства активного ила, обусловленные большим проявлением гранулообразующих свойств. Интерпретация наблюдаемых положительных эффектов на биохимическом и генетическом уровнях дана на основе существующих литературных данных.

Предложен способ реализации микробиологического процесса «контролируемый оксидативный стресс» (регулируемое оксидативное воздействие, РОВ-технология), учитывающий важную эколого-физиологическую роль совместного воздействия стрессорных (в частности,  $H_2O_2$ ) и антистрессорных факторов в регулировании жизнедеятельности и жизнеспособности микробных клеток и обоснована необходимость поддержания состояния оптимального оксидативного воздействия в высокоплотных популяциях микроорганизмов, микробиологических системах культивирования, биореакторах нового поколения. Сформулировано положение о важности контролирования низкоэнергетических, низкоинтенсивных воздействий на клетки микроорганизмов, находящихся в состоянии стресса.

#### **Практическая значимость и реализация результатов исследований.**

Результаты проведенных исследований могут быть положены в основу создания новых экологически чистых, ресурсосберегающих, высокопроизводительных и малоотходных способов совершенствования традиционных систем микробиологического синтеза, переработки отходов, высококонцентрированных токсичных стоков и глубокой биологической очистки сточных вод, в том числе:

– **Высокоплотностное культивирование** с дробной подпиткой субстратом (при получении кормовых дрожжей) с повышением выхода биомассы на 5–15% при обеспечении уровня

накопления клеток до 150–170 г/л (для кормовых дрожжей по сухой биомассе), производительности биореакторов от 1,1 до нескольких раз (при окислении фенола).

– **Биодеструкция** с дробной подпиткой субстратом, полной минерализацией высококонцентрированных токсичных стоков и минимальным образованием вторичных сточных вод (при биодеструкции фенола).

– **Мембранный биореактор** с отъемно-доливным культивированием – на примере молочнокислых бактерий и биосинтеза молочной кислоты.

– Культивирование с подавлением абиотических реакций, сопровождающих ферментационный процесс. Вариант такого метода – **адсорбционная культура** в применении к глубинному культивированию галобактерий *H. salinarum* и синтезу ими бактериородопсина с резким улучшением показателей роста галобактерий, повышением содержания бактериородопсина в клетках и выходом его за цикл ферментации с 50–70 мг/л за 6–7 сут. для обычной периодической культуры до 1700–1750 мг/л за 8 сут. для адсорбционной культуры при минимальном содержании каротиноидов, что резко облегчает задачу выделения бактериородопсина (в составе пурпурных мембран) и его очистки, в несколько раз снижает объем высокоминерализованных жидких стоков и стоимость бактериородопсина до нескольких десятков раз.

– Культивирование при одновременном воздействии ультрафиолета ближнего диапазона спектра (УФА, УФБ) и видимого света – **«солнечный биореактор»** – на примере дрожжей рр. *Candida* (при получении кормовой биомассы) и *Saccharomyces* (при этанольном брожении).

– Культивирование с добавлением пероксида водорода и воздействием видимого света – **искусственная пероксисома** – на примере высокоплотностной системы культивирования дрожжей р. *Candida*, этанольного брожения дрожжами-сахаромицетами, биодеструкции фенола в составе высококонцентрированных сред, биологической очистки сточных вод пивоварения и хозяйственно-бытовых стоков, позволяющее существенно улучшить выходные показатели биосинтеза и биологической очистки. Данный способ может быть реализован на сооружениях аэробной биологической очистки сточных вод на основе аэротенков и других систем с активным илом, в режиме с полным возвратом активного ила с повышением скорости биодеструкции в 1,1–2 раза, снижением содержания остаточных загрязнений (по ХПК) в 1,5–3 раза при дополнительных эксплуатационных затратах не более 10–30% от затрат на аэрацию. Опытные-промышленные испытания технологии с регулируемым окислительным воздействием (РОВ-технологии) на поселковых и городских очистных сооружениях в Московской области подтвердили положительные эффекты, наблюдавшиеся в лабораторных исследованиях.

Исследования выполнялись в рамках госконтрактов, поддержанных Минобрнаукой и Рособразованием и с участием: фирмы «Энвирос-Хеми ГмбХ» (Германия) – при очистке сточных вод предприятий ОАО «Пивоваренная компания «Балтика» в гг. Самара и Хабаровск, Вороновского завода по производству солода (Моск. обл.); Серебряно-Прудского биохимического завода (Моск. обл.) – при изучении процессов спиртового брожения и обезвреживания зерно-спиртовой барды в анаэробных и аэробных системах с гранулированным илом; АО «Северсталь» – при изучении биологической очистки сточных вод коксохимического производства; с ФГУП НПО «Астрофизика» – при изучении воздействия света на процессы культивирования дрожжей и биологической очистки сточных вод; университета Тон Дзи (г. Шанхай, КНР) – при изучении процессов биологического удаления азота и методов борьбы с микроводорослями и цианобактериями с использованием окислительного стрессового воздействия при эвтрофикации водоемов; ГосНИИсинтезбелок – при изучении процессов культивирования кормовых дрожжей и получения галобактерий; с ФГУП ГосНИИгенетика – при изучении процессов культивирования галобактерий и биосинтеза бактериородопсина (Складнев Д.А.), а также процессов культивирования рекомбинантных штаммов-продуцентов рибофлавина (Миронов А.С.); с ИМГ РАН – при изучении процессов образования биопленок (Хмель И.А.); с НПФ ТЭКО – при изучении процессов биологической очистки в мембранном реакторе (Свитцов А.А.); ООО «ТДС» – при проведении испытаний биологической очистки хозяйственно-коммунальных стоков на поселковых и городских очистных сооружениях (Мелиоранский А.В.), а также в сотрудничестве с кафедрой нефтехимического синтеза РХТУ – при разработке технологии получения молочной кислоты (Швец В.Ф., Козловский

Р.А.) и кафедрой промышленной экологии РХТУ – при изучении процессов гранулообразования с воздействием активных форм кислорода (Кручинина Н.Е.).

Часть из предложенных решений не имеет отечественных и мировых аналогов. На разработанные способы совершенствования биотехнологических процессов получены патенты РФ: № 2188164 от 27.08.02, № 2209186 от 26.12.2003, № 2268924 от 23.11.2004, № 2268924 от 23.11.2004, № 2323226 от 30.05.2006, № 2323251 от 30.05.2006, № 2394098 от 10.06.2009, № 2586155 от 05.03.2015, № 2712703 от 30.01.2020.

Материалы диссертации нашли свое отражение в учебном процессе при чтении лекций по курсам «Введение в экобиотехнологию», «Экобиотехнология» и частично отражены в учебных пособиях: Научные основы экобиотехнологии (Кузнецов А. Е., Градова Н.Б. – М.: Мир, 2006. – 504 с.); Прикладная экобиотехнология (Кузнецов А.Е. и др., в 2-х т. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний. – 2010, переиздание 2012 г., электронная версия – 2015 г.) т. 1 – 629 с., т.2 – 485 с.

**Апробация работы.** Основные положения диссертационной работы были неоднократно доложены на международных и всероссийских научно-технических конференциях и семинарах, в том числе: 13 Int., 15 Int. Congress of Chemical and Process Engineering «CHISA-98», «CHISA-2002» (Praha, 1998, 2002); 3–6 Международных Конгрессах «Окружающая среда для нас и будущих поколений: экология, бизнес и экологическое образование» (Самара, 1998 – 2003 г.г.); ISEB'99 Meeting Biopolimers (Germany, Leipzig, 1999); 7th International FZK/TNO conference on contaminated soil (Germany, Leipzig, 2000); 8ème Congrès Francophone de Génie des Procédés (Nancy, France, 2001), Международных конгрессах «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2002, 2003, 2007, 2009, 2011, 2013, 2015, 2017), Международной конференции «Высокие технологии XXI века» (Москва, 2008, 2009), Международной научно-практической конференции «Биотехнология: наука и практика» (Ялта, Крым, 2018, 2020), а также на заседании НТС Министерства ЖКХ Московской области 16.07.2020.

**Публикация результатов исследований.** По материалам диссертации опубликовано около 110 работ, получено 9 авторских свидетельств и патентов РФ на изобретения. Ряд полученных результатов нашел свое отражение в четырех учебных пособиях и монографии, написанных с участием автора.

**Структура и объем работы.** Диссертационная работа состоит из введения с постановкой задач исследований, глав 1 и 2, посвященных обзору литературы, главы 3 с описанием объектов исследования и их особенностей, главы 4 с описанием условий проведения экспериментов, материалов и методов анализа, главы 5 с изложением и обсуждением результатов исследований при получении продуктов биосинтеза, главы 6 с изложением и обсуждением результатов исследований по биологической очистке сточных вод, заключения, выводами, списка литературы и приложений.

Материал изложен на 708 страницах машинописного текста и содержит 23 таблиц, 114 рисунков и 5 приложений. Список литературы включает 1941 наименований работ, из них 1726 работ зарубежных авторов.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**Во введении** сформулированы основы экологически рационального совершенствования ферментационных процессов: сочетание по месту и времени абиотических и биотических реакций (совмещенные, гибридные системы); привлечение факторов и моделирование условий самоочищения, особенно важных для устойчивого функционирования замкнутых природных экосистем, в ферментационных процессах; оптимальное управление стрессовыми воздействиями на популяции микроорганизмов.

**В первой главе** проанализировано и обобщено состояние исследований в области совершенствования процессов ферментации и биологической очистки сточных вод, включающих рецикл постферментационных сред или их компонентов на стадию биосинтеза после выделения из них целевого продукта, ведение ферментационного процесса в режиме лимитирования по граничным значениям параметров, энерго- и ресурсосбережение, высокоплотностное культивирование с дробной подпиткой субстратом, организацию локальных систем биологической очистки, ведение аэробной очистки с полным рециклом активного ила, интенсификацию биологической очистки, внедрение анаэробно-аэробных методов при очистке стоков с высокой концентрацией

загрязнений. Рассмотрены ферментация с селективным извлечением продуктов биосинтеза, с диализом и электродиализом, с жидкостной экстракцией, с вакуумным удалением летучих продуктов, с адсорбцией. Особое внимание уделено мембранному биореактору. Отдельно рассматриваются варианты культивирования с совмещением химических, фотохимических и биологических реакций и использованием абиотических природных процессов самоочищения с участием АФК.

АФК, образуемые в природе и техногенно, относятся к основным факторам, индуцирующим в живых клетках состояние оксидативного стресса. В этой связи **во второй главе** рассмотрены различные стрессовые воздействия, их особенности, адаптация микробных популяций к стрессорам и системы ответа на стресс (осмотический и кислотный стресс, тепловой и холодный шок, действие токсичных веществ, оксидативный стресс) у микроорганизмов на различных уровнях (популяционном, фенотипическом, физиологическом, клеточном, биохимическом, эпигенетическом и генетическом). В ответе на оксидативный стресс подробно рассмотрены участие веществ-антиоксидантов, энзиматическая защита, ответ на генетическом уровне, системы репарации при повреждении ДНК, адаптивные изменения, перекрестные ответы на оксидативный и другие виды стресса. Выделены следующие особенности: 1) регуляторные функции пероксида водорода и других АФК в живых клетках, образующихся внутриклеточно или в результате действия внеклеточных источников; 2) возникновение фоточувствительности к низкоинтенсивному видимому свету в результате протекания фотореактивации (фоторепарации) у стрессированных микроорганизмов, в том числе при перекрестных ответах на разные виды стресса; 3) совместные воздействия стрессоров и антистрессоров, наблюдаемое в природе, примером которых является одновременное прооксидантное и антиоксидантное действие химических веществ, находящихся в среде; 4) наличие немногочисленных данных о положительном действии стресса на отдельные показатели биосинтеза, что может быть использовано на практике. Рассмотренные особенности ответа на стрессовое воздействие популяций и клеток микроорганизмов создают предпосылки и основу для постановки задачи использования данных особенностей в управляемом культивировании микроорганизмов.

Метод управления биопроцессом применительно к контролируемому совместному действию стрессоров и антистрессоров с одновременным, сопряженным протеканием микробиологических, химических и фотохимических реакций и оптимальным балансом стресс-антистрессовых воздействий, избирательным усилением или подавлением их действия на микроорганизмы охарактеризован как **контролируемый стресс** или **контролируемый оксидативный стресс**. Удобным и эффективным приемом с методической, технологической и экологической точек зрения может быть воздействие малых, сублетальных доз  $H_2O_2$  (фактор с оксидантной активностью) и низких доз видимого света (может выступать как фактор с прооксидантной и одновременно с антиоксидантной активностью, в последнем случае действующий, предположительно, через механизм фоторепарации).

**В третьей главе** описываются объекты исследований, в том числе микроорганизмы, имеющие практическое значение для промышленной биотехнологии, в природных условиях обитающие в эпифитной зоне растений, на освещаемой Солнцем поверхности почвенных и водных сред, где возможны условия с оксидативным стрессовым воздействием.

*В процессах микробиологического синтеза:*

– *Молочнокислородное брожение для получения молочной кислоты.* Работы проводились в рамках проекта Минобрнауки № 14.577.21.0037. Разрабатываемая в составе группы соисполнителей технология предусматривала получение нативного раствора лактата аммония из различных видов сахаросодержащего сырья для последующего получения полилактида и/или других продуктов на основе молочной кислоты с максимальным выходом конечного продукта. По результатам рассмотрения литературных данных сделан вывод, что наиболее актуальной задачей при микробиологическом получении молочной кислоты является снижение затрат на питательные субстраты, в первую очередь, на ростовые факторы, а также повышение продуктивности биореактора при одновременном обеспечении высокого выхода и конечной концентрации молочной кислоты, снижении содержания побочных компонентов нативных растворов, обеспечении устойчивости биосинтеза к контаминации. При этом наиболее рациональным решением при выборе продуцентов остается ис-

пользование традиционных молочнокислых бактерий с природным геномом по причине большей стабильности процесса, возможности релизации непрерывной ферментации без потери целевой физиологической и биосинтетической активностей.

– *Дрожжи р. Candida* – исследовалось высокоплотностное культивирование с дробной подпиткой концентрированным субстратом (fed batch cultivation), как вариант малоотходного процесса для получения кормовых продуктов, рекомбинантных белков, позволяющий накопить к концу ферментации до 100 г/л и более сухой биомассы, обеспечить высокую производительность биореактора, снизить объемы сточных вод и затраты на концентрирование продукта. Ограничениями метода высокоплотностного культивирования являются постепенное накопление внеклеточных метаболитов, ингибирующих процессы роста и биосинтеза, а также более высокие требования к качеству используемых субстратов и к обеспечению массообмена по кислороду.

– *Этанольное брожение дрожжами-сахаромицетами*. По результатам обзора литературы и существующих технологических вариантов микробиологического получения этанола на российских заводах сделан вывод о целесообразности исследования метода культивирования дрожжей-сахаромицетов с целью получения качественного посевного материала с минимальным содержанием посторонней микрофлоры и использованием  $H_2O_2$  не только как бактерицидного средства, но и агента, регулирующего физиологическое состояние клеток дрожжей.

– *Галобактерии* как источник ценных веществ кормового, лечебно-профилактического и технического назначения. Кратко рассмотрены основные сферы их применения, особенности культивирования, пути совершенствования ферментационного процесса. Отдельное внимание уделено биосинтезу бактериородопсина, который с конца 1970-х и до настоящего времени рассматривался как перспективный материал технического, ветеринарного и косметического назначения. В диссертационной работе представлены результаты исследований по культивированию галобактерий прежде всего с целью повышения уровня накопления и выхода БР, в частности в варианте культивирования с адсорбентом.

– *Рекомбинантные штаммы Bacillus subtilis* – продуценты рибофлавина и трансформанты по рибофлавиновому оперону. Рибофлавин проявляет фотосенсибилизирующие свойства, обладает антиоксидантной и прооксидантной активностью. Принимая во внимание эти свойства рибофлавина при его сверхсинтезе, было интересно провести исследования прежде всего с точки зрения проверки эффективности методологии контролируемого оксидативного воздействия как в отношении рекомбинантных штаммов, так и в отношении сверхсинтеза рибофлавина.

*В процессах биологической очистки сточных вод* акцент был сделан на исследование очистки в различных режимах при контролируемом оксидативном воздействии. Использовались:

– Модельные и реальные фенол-, азот- и фосфорсодержащие стоки. Исследования проведены в режимах очистки: периодическом, непрерывном хеостатном, с рециклом биомассы (в аэротенке с вторичным отстойником, а также в мембранном биореакторе), с дробной подпиткой для минерализации высококонцентрированного субстрата (фенола).

– Модельные и реальные сточные воды пивоваренной промышленности. Исследования проведены в режимах очистки: периодическом, непрерывном с рециклом биомассы (в аэротенке с вторичным отстойником с частичным и полным рециклом активного ила) и в циклическом отъемно-доливном режиме (в SB-реакторе).

– Модельные хозяйственно-бытовые стоки – очистка в режимах: периодическом, непрерывном и в мембранном реакторе.

– Очистка с образованием биопленок и гранул ила в аэробных условиях, а именно выявлялось влияние оксидативного воздействия на систему Quorum Sensing и образование биопленок, на гранулообразование при очистке в SB-биореакторе.

– Очистка с участием микроводорослей и цианобактерий. Исследования проводились применительно к очистке модельных стоков пивоварения, оценке роли автотрофных компонентов сообщества, спонтанно сформированного в лабораторном биореакторе в условиях его освещения видимым светом, в ухудшении качества очистки и возможности целенаправленного воздействия на антагонистические и симбиотические взаимоотношения в альгобактериальных и цианобактериальных сообществах при использовании контролируемого оксидативного воздействия.

Для всех стоков дана их краткая характеристика. Рассмотрены особенности биологической очистки, существующие проблемы и пути повышения ее эффективности с точки зрения разработки более чистых, малоотходных, малосточных, высокоинтенсивных и низкостратных методов микробиологической очистки и обезвреживания сточных вод, шламов, вторичных отходов.

Как и в исследованиях процессов биосинтеза, особое внимание было уделено способам очистки с внесением в очищаемую среду пероксида водорода, как агента, играющего важную роль в самоочищении природных водных сред, в регуляции физиологического состояния микробных популяций и повышающего биодоступность стойких загрязнений, а также комбинированному, сочетанному воздействию  $H_2O_2$  и видимого света.

**В главе 4** описаны условия проведения экспериментов, материалы и методы анализа. Использовались как стандартные установки и методы культивирования: в планшетах, пробирках, колбах, ферментерах, так и модифицированные варианты, апробированные с описанными в главе 3 микробиологическими объектами культивирования. Стандартными методами получали накопительные культуры (изоляты), готовили посевной материал. Использовали как стандартные, так и модифицированные питательные среды, методы анализа: физико-химические, химические, микробиологические, оценивали и контролировали морфологическое, физиолого-биохимическое состояние популяций микроорганизмов и их сообществ, процессы образования гранул и биопленок при исследовании аэробной биологической очистки с использованием методов микроскопирования, окрашивания красителями, определения дыхательной, бродильной, дегидрогеназной, каталазной активностей, фотоэлектроколориметрических и спектроскопических методов.

В исследованиях с галобактериями использовали модифицированную методику для анализа содержания БР в клетках спектрофотометрическим методом. Качественная оценка характера биосинтеза при культивировании галобактерий и накопления БР возможна по изменению цвета бактериальной суспензии по ходу ферментации, для чего был разработан экспресс-метод, основанный на фиксации цвета суспензии в кювете при помощи фотосканера. Отсканированные изображения анализировались на содержание цветовых компонентов (красный, зеленый, синий) при помощи графического редактора Photoshop. Имея карту цвета, можно достаточно надежно оценить эволюцию цвета по ходу ферментации и наличие бактериородопсина в клетках.

В табл. 1 представлен перечень вариантов культивирования, модифицированных по отношению к стандартным методам периодической и непрерывной ферментации, используемые объекты культивирования и полученные с ними основные результаты экспериментов.

Важным методическим приемом в работе было получение методом последовательных пассажей культур микроорганизмов или их изолятов, адаптированных (преадаптированных) к воздействию стрессоров и активных в отношении деструкции органических токсикантов, содержащихся в стоках в различных концентрациях. Прибегали к ступенчатой адаптации, постепенно повышая концентрацию биостойкого и/или токсичного субстрата или дозу стрессора, в частности,  $H_2O_2$ . При этом учитывали состояние, фазу роста, плотность микробной популяции, подвергаемой стрессорному воздействию. Методом последовательного пассирования с последующим рассевом на твердые среды или без посева были получены:

- бактериальные и дрожжевые консорциумы, способные окислять фенол при повышенных концентрациях последнего (до 5 г/л) с высокой скоростью;
- консорциумы микроорганизмов, составляющие основу активных илов, для исследования процессов биологического окисления сточных вод;
- сообщества микроорганизмов, способные к образованию гранулированного активного ила при биологической очистке сточных вод;
- изоляты микроводорослей и цианобактерий, входящих в состав отобранных образцов альгобактериальных и цианобактериальных консорциумов;
- микроорганизмы и их консорциумы, устойчивые к повышенным дозам пероксида водорода (при изучении контролируемого оксидативного воздействия).

Вместе с тем, при работе с рекомбинантными штаммами микроорганизмов процедура последовательных пересевов может привести к быстрой утрате изначальных свойств продуцента.

Таблица 1 – Сопоставление модифицированных вариантов культивирования в биореакторах с объектами культивирования и целями исследований

| Вариант культивирования   | Объекты культивирования   | Цели и результаты исследований   |
|---|---|--|
| Высокоплотностное культивирование с подпиткой субстратом, замкнутая высокоинтенсивная система биологической очистки.  | Дрожжи р. <i>Candida</i> .<br>Микроорганизмы-фенолеструктуры.   | Снижение расходов на выделение биомассы и объема сточных вод.<br>Повышение окислительной мощности, снижение объема вторичных отходов.  |
| Культивирование в мембранном биореакторе с выводом продуктов биосинтеза.  | Молочнокислые бактерии р. <i>Lactobacillus</i> .  | Повышение продуктивности, выхода молочной кислоты, снижение количества образующихся побочных продуктов и твердых отходов, экономия затрат.   |
| Адсорбционная культура.   | Галобактерии <i>Halobacterium salinarum</i> .   | Повышение выхода биомассы и содержания бактериородопсина.  |
| Биологическая очистка в аэротенке с полным рецилом активного ила.   | Активный ил, модельные стоки.   | Снижение количества избыточного активного ила. Аprobация возможности гранулообразования аэробного ила.   |
| Биологическая очистка с гранулированным илом, SB-реактор.   | Активный ил, модельные стоки.   | Повышение стабильности гранул, эффективности удаления фосфора из сточных вод.  |
| Гибридный процесс с одновременным химическим и биологическим окислением.  | Дрожжи и бактерии – де-структуры фенола.  | Повышение скорости и качества биологической очистки сточных вод.   |
| Контролируемый оксидативный стресс с одновременным воздействием видимого света и ультрафиолета УФА-диапазона – «Солнечный» биореактор.  | Дрожжи рр. <i>Candida</i> , <i>Saccharomyces</i> .  | Улучшение целевых выходных показателей.  |
| Контролируемый оксидативный стресс с одновременным воздействием видимого света и активных форм кислорода ( $H_2O_2$ , анолит электрохимического разложения), в том числе в мембранном биореакторе («Искусственная перокси-сома»). | Дрожжи рр. <i>Candida</i> , <i>Saccharomyces</i> , бактерии рр. <i>Bacillus</i> , <i>Lactobacillus</i> .<br>Активные илы очистных сооружений, микроводоросли. | Повышение продуктивности биореактора, выхода целевого продукта.<br>Повышение степени очистки, скорости и стабильности биопленок и гранулообразования, проницаемости мембран в МБР. |
| Культивирование с подавлением абиотических реакций, сопровождающих ферментационный процесс.   | Галобактерии <i>Halobacterium salinarum</i> .<br>Штаммы-трансформанты продуцента рибофлавина р. <i>Bacillus</i> .   | Повышение содержания бактериородопсина.<br>Повышение устойчивости биосинтеза и выхода рибофлавина.   |

При адаптации микроорганизмов к оксидативному стрессу осуществляли серию последовательных пересевов культуры на фоне воздействия стресс-факторов, среди которых наиболее часто применяли пероксид водорода, и антистресс-факторов, наиболее часто – видимый свет относительно низкой интенсивности. Такое целенаправленное воздействие проводили при культивировании дрожжей рр. *Candida*, *S. cerevisiae*, молочнокислых бактерий р. *Lactobacillus*, рекомбинантных бактерий р. *Bacillus*, при изучении процессов аэробной биологической очистки и образования гранулированного активного ила в аэробно-анаэробном отъемно-доливном режиме.

Преадаптация микроорганизмов активного ила к оксидативному стрессу в типовом случае проводилась при культивировании при комнатной температуре в периодическом режиме в конических колбах на шейкере при освещенности от 100 до 3000 Лк на поверхности колб, а также в затемненных колбах.

Особенностью во многих вариантах культивирования было целенаправленное экранирование или, наоборот, освещение среды видимым светом содержимого колб и биореакторов, в кото-

рых выращивались микроорганизмы. При целенаправленных исследованиях освещение содержимого биореактора видимым светом производилось через его стеклянную обечайку. Колбы в шейкере освещались лампами дневного света или светодиодными матрицами. Интенсивность облучения (энергетическая облученность в пересчете на длину волны  $\lambda$  555 нм) составляла 0,01–1 Вт/л (в зависимости от варианта постановки опыта). Так, при освещении биореакторов светом лабораторного помещения (люминесцентные лампы дневного света), средняя энергетическая облученность по видимому свету на поверхности обечайки биореактора после пересчета в энергетическую облученность на 1 л среды в реакторе составляла 40 мВт/л.

При исследовании оксидативного воздействия, индуцированного облучением мягким ультрафиолетом, и проведении экспериментов с дрожжами р. *Candida* в колбах в качестве стресс-фактора использовалось мягкое УФА-излучение ( $\lambda_{\text{max}} = 360\text{--}370$  нм). При проведении экспериментов в биореакторе облучение ультрафиолетом проводили сфокусированным и направленным потоком ультрафиолета через выносную проточную кварцевую кювету, через которую постоянно циркулировала дрожжевая суспензия.

О результатах оксидативного воздействия АФК ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , УФА-излучение) в биореакторах на микроорганизмы судили по изменению хода кривых зависимости  $\text{pO}_2$ , pH, Eh от времени, а также путем сравнения кривых роста биомассы. Наиболее подходящие условия (концентрация биомассы, интенсивность облучения, доза стрессора, интенсивность перемешивания) для выявления отклика системы на стрессорное действие АФК определяли в предварительных экспериментах.

**В пятой главе** приведены результаты экспериментов с получением продуктов микробиологического синтеза.

Исследования по получению *молочной кислоты* включали как традиционные подходы в подборе более рациональных условий культивирования продуцентов, так и апробацию решений с использованием мембранного биореактора при культивировании продуцента в отъемно-доливном режиме, а также контролируемого оксидативного воздействия. Отъемно-доливной режим позволяет снизить ингибирование биосинтеза накапливаемой молочной кислотой и в то же время обеспечить более высокую конверсию субстрата в целевой продукт – молочную кислоту. Было важно выяснить основные факторы, влияющие на показатели микробиологического синтеза, отработать приемы поддержания высокой физиологической активности продуцента и режимы высокопроизводительного культивирования. Из штаммов лактобацилл, приобретенных из ВКПМ, штамм *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* В-4079 обладал наибольшей удельной биосинтетической (бродильной) активностью, синтезировал L-молочную кислоту с оптической чистотой не менее 98 % с уровнем накопления не менее 100 г/л на среде с глюкозой и выходом до 95–97% от субстрата, продуктивностью биореактора в режиме периодического культивирования 3–5 г/л.ч, с накоплением молочной кислоты до 170 г/л и минимальным – побочных продуктов. Последнее важно на последующей стадии выделения молочной кислоты из культуральной жидкости. По продуктивности штамм В-4079 не менее чем в 2 раза превосходил остальные штаммы.

С отобранным штаммом *L. paracasei subsp. paracasei* В4079 была проведена серия предварительных экспериментов по подбору наиболее подходящих условий роста и синтеза МК, прежде всего таких наиболее очевидных для ферментации, как физико-химические параметры окружения, условия аэрации, состав питательной среды; было оценено влияние источника углерода (глюкозы, свекловичной мелассы, в том числе после кислотного гидролиза), источника и содержания ростовых факторов в питательной среде на показатели биосинтеза. Исследования показали возможность снижения содержания ростовых факторов до 3-х раз по сравнению со стандартными средами и замены дрожжевого экстракта на более дешевые компоненты (гидролизаты на основе компонентов сои).

В экспериментах с культивированием *L. paracasei* В-4079 в мембранном биореакторе были подобраны оптимальные условия и режимы биосинтеза, размер, материал и режимы работы выносного мембранного волоконного модуля для отвода молочной кислоты вместе с побочными низкомолекулярными продуктами биосинтеза и остаточными компонентами питательной среды. Исследования показали, что в циклическом отъемно-доливном режиме ферментации в МБР без отвода биомассы по мере увеличения количества циклов наступает динамическое равновесие между приростом биомассы и лизисом уже накопленных клеток, при котором содержание клеток

в ферментационной среде достигает максимальной величины 35–40 г асб/л при отсутствии синтеза вязких полисахаридов и контаминации (в отличие от хеостатного режима). Равновесие зависит от скорости подачи питательной среды в реактор, частоты циклов, длительности интервалов без подачи субстрата между циклами, доли отводимой бесклеточной среды в виде фильтрата в каждом цикле, состава питательной среды и физиологического состояния клеток продуцента. Достижение высокой концентрации биомассы в биореакторе при поддержании ее высокой физиологической активности является решающим в обеспечении высокой продуктивности биореактора. При этом голодание клеток продуцента после исчерпания субстрата в течение 4 ч является критическим, после которого бродильная активность лактобацилл начинает быстро и необратимо падать. В оптимальных условиях (концентрация глюкозы в подпитке 100 г/л, дрожжевого экстракта 5 г/л) штамм В-4079 синтезировал L-молочную кислоту со степенью конверсии основного субстрата (глюкозы) в МК близкой к 100%.

С учетом полученных данных был подготовлен и проведен длительный пробег с культивированием *L. paracasei* В4079 в лабораторном биореакторе Minifors (INFORS, Швейцария) с рабочим объемом среды 1,5–3 л, оснащенный мембранным половолоконным модулем с мембранами ВПУ-300ПС с рабочей поверхностью 0,1 м<sup>2</sup>. Культивирование велось на протяжении 18 сут. в отъемно-доливном режиме без остановки процесса при принудительном концентрировании биомассы и без ее отвода из биореактора. Всего был осуществлен 131 цикл отъема-долива. Результаты пробега представлены на рис. 1. Среднее содержание молочной кислоты в полученном пермеате по результатам лабораторного пробега составило 102,1 г/л, выход молочной кислоты с единицы субстрата 95%. Остаточное содержание глюкозы в фильтрате по окончании цикла, как правило, не превышало 1 г/л, что важно для обеспечения высокой степени конверсии глюкозы в молочную кислоту и для последующего ее выделения. В качестве основных побочных продуктов были идентифицированы органические кислоты (лимонная, уксусная) – не более 1,2 г/л, аминный азот – не более 0,07 г/л.

Исследования показали, что отъемно-доливной режим биосинтеза молочной кислоты в МБР позволяет увеличить продуктивность биореактора до 50 г/л.ч, превышающей таковую в 5–10 раз по сравнению с обычным одноступенчатым периодическим процессом, периодическим культивированием с подпиткой, непрерывным хеостатным или проточным в мембранном биореакторе, культивированием с иммобилизованными клетками. Процесс можно вести без отвода накапливаемой избыточной биомассы – несколько недель и более при условии поддержания высокой концентрации физиологически активной биомассы, отсутствии остановок длительностью более 2 час на фильтрацию и отвод бесклеточной культуральной жидкости, содержащей молочную кислоту, из биореактора, при содержании молочной кислоты 100 г/л, степени конверсии глюкозы в молочную кислоту 95–97%, снижении расходов на ростовые факторы в 3 раза по сравнению со стандартными прописями. Снижение концентрации дорогостоящих ростовых факторов в подаваемой питательной среде с 15 г/л до 5 г/л особенно важно для уменьшения затрат на биосинтез МК, уменьшения содержания примесей в фильтрате культуральной жидкости и в получаемом полупродукте на стадии выделения молочной кислоты, и, как следствие, – для улучшения экономических показателей биосинтеза и достижения конкурентоспособной цены.

Разработанный метод отъемно-доливного культивирования имеет определенные экологические преимущества. Количество образуемой избыточной биомассы составляет не более 4,5 г/кг молочной кислоты, что ниже в 10 раз по сравнению с традиционным методом периодического культивирования при полном отсутствии гипса как отхода. В оптимальных условиях в образующейся культуральной жидкости с молочной кислотой содержится суммарно не более 2,5 г/л побочных продуктов биосинтеза. Единственными существенными отходами стадии ферментации являются отработанные моющие и промывные растворы, образуемые с периодичностью не чаще 1 раза в 2–4 недели в объеме не более 5 м<sup>3</sup>/м<sup>3</sup> объема ферментера или ориентировочно не более 0,5 м<sup>3</sup> сточной воды на 1 т молочной кислоты. По сравнению с традиционным в разработанном методе количество образуемых отходов на стадии биосинтеза ниже:

- по твердым отходам – в 170 раз;
- по образуемой избыточной биомассе – в 10 раз;
- по аммонийному азоту, фосфатам, ХПК, минеральным солям – в 25–30 раз.

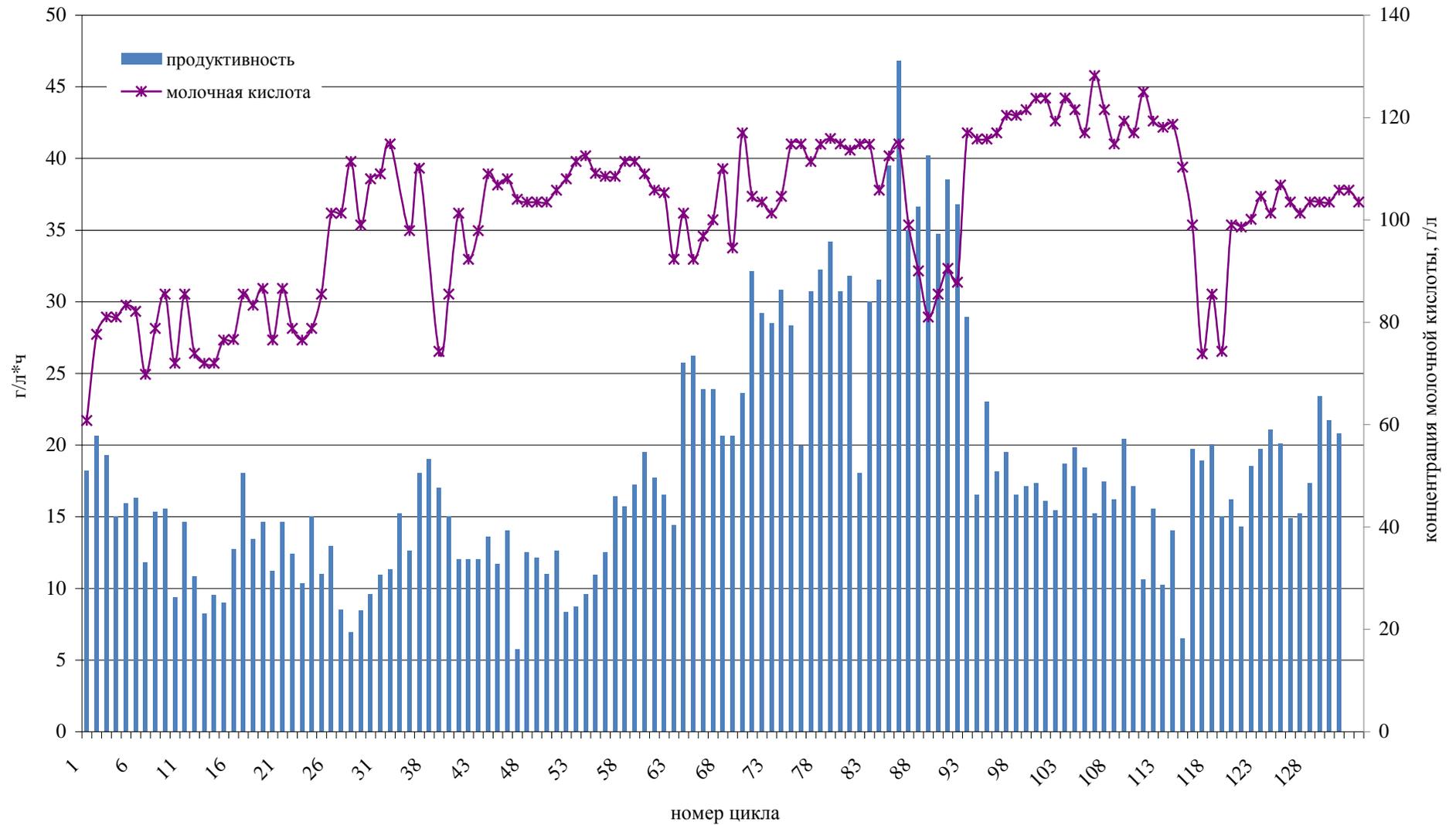


Рисунок 1 – Изменение продуктивности мембранного биореактора (по накоплению молочной кислоты) и концентрации молочной кислоты в фильтрате по окончании цикла в процессе отъемно доливного культивирования в течение 18 сут.

Таким образом, по совокупности показателей разработанный отъемно-доливной метод культивирования в мембранном биореакторе для получения молочной кислоты из глюкозы превышает существующие решения.

Недостатками ферментации в отъемно-доливном режиме в МБР являются более высокие требования к системе регулирования и автоматизации для соблюдения режима отъема-долива, относительная чувствительность к предельным отклонениям в параметрах культивирования, в частности, к содержанию ростовых факторов, а также к перерывам в культивировании из-за наличия процедуры фильтрации, которые не должны превышать 2–3 час. При отклонении выше предельных значений последующий возврат к оптимальным параметрам не приводит к восстановлению высокой физиологической активности популяции, т.е., выражаясь языком теории бифуркаций, в режиме высокой физиологической активности система находится в относительно устойчивом состоянии, при выходе из которого она уже неспособна обратимо вернуться в это состояние. Для ее восстановления необходимо запускать весь процесс культивирования заново, уменьшая содержание биомассы до начальных значений, соответствующих таковым при исходном засеве биореактора.

На основе полученных результатов были разработаны:

1. Проект технического задания на проведение ОКР по теме: «Создание опытного образца установки производства полилактида (мощностью не менее 1300 тонн в год по потребляемой глюкозе) по комплексной технологии, базирующейся на молочной кислоте (в виде лактата аммония), полученной биокаталитической переработкой сахаросодержащего сырья».

2. Разовый технологический регламент и базовая схема технологического процесса на получение L-молочной кислоты в виде лактата аммония в составе постферментационной среды (бесклеточной культуральной жидкости, КЖ) методом микробиологического синтеза с использованием бактериального штамма *Lactobacillus casei subsp. paracasei* ВКПМ В 4079 из различных видов глюкозосодержащего сырья для последующего производства L-молочной кислоты полимерного качества на опытной установке, мощностью не менее 1300 тонн в год по потребляемой глюкозе. Получаемая бесклеточная КЖ предназначена для последующего выделения молочной кислоты (в виде бутиллактида), получения лактида и полилактида в количестве 500 т/год по полилактиду.

По результатам полученных данных выполнены оценочные расчеты затрат на получение молочной кислоты по разработанному отъемно-доливному культивированию в мембранном биореакторе.

В базовом варианте при использовании опытной установки мощностью 1300 тонн в год по потребляемой глюкозе себестоимость получения молочной кислоты на стадии биосинтеза в виде фильтрата культуральной жидкости составит около 900 евро/т МК, себестоимость получаемого полилактида с учетом амортизации – около 1500 евро/т. Капитальные затраты на оборудование для стадии биосинтеза молочной кислоты, включая вспомогательное оборудование, оценены в 4,5 млн. евро.

Мембранный биореактор часто рассматривают как вариант высокоплотного культивирования, при котором биосинтез протекает при повышенной концентрации биомассы в ферментационной зоне, за счет чего обеспечивается его высокая продуктивность. Вместе с тем он не дает существенных экологических преимуществ с точки зрения снижения объема жидких стоков (культуральных жидкостей). Последнее может быть обеспечено при таком высокоплотном культивировании, когда ферментация ведется в периодическом режиме с дробной подпиткой субстратом без отвода продуктов биосинтеза из ферментационной среды. Идея применения оксидативного воздействия, а именно пероксидом водорода к такому методу ферментации была основана на вышеотмеченной аналогии функционирования  $H_2O_2$  в природных водоемах, как агента самоочищения. Изначально предполагалось, что воздействие оптимальных сублетальных доз  $H_2O_2$  на выращиваемые микроорганизмы может привести к снижению содержания внеклеточных продуктов метаболизма – ингибиторов биосинтеза в ферментационной среде.

Апробация высокоплотного культивирования с подпиткой субстратом (сахарозой) показала, что в этом случае наблюдается не только увеличение общего уровня накопления биомассы дрожжей в ферментере, но и удельного выхода биомассы с единицы субстрата – с 0,5 до 0,6 г/г без изменения содержания сырого протеина в дрожжах. Продуктивность биореактора по био-

массе дрожжей увеличилась с 2,5–3 г асд/л.ч до 3–4 г асд/л.ч (в зависимости от режима подпитки). При высокоплотном культивировании возможно снижение содержания азота, вносимого в исходную питательную среду с минеральными солями, до уровня в 2–3 раза ниже необходимого, исходя из материального баланса. Остальное количество азота можно вводить с аммиачной водой, используемой в качестве титрующего реагента.

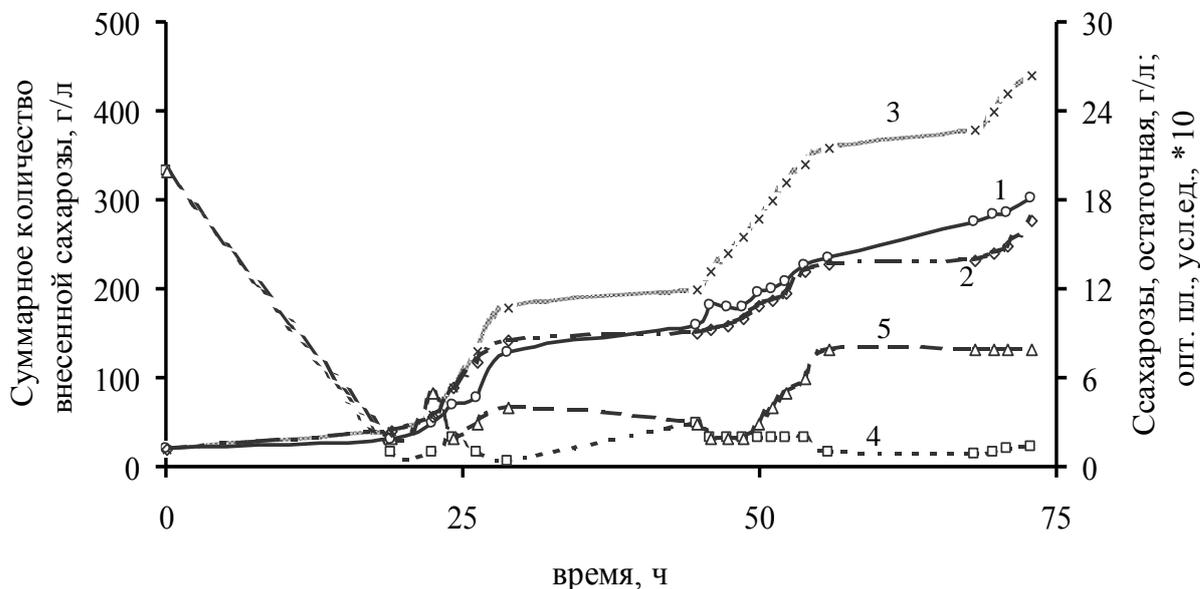


Рисунок 2 – Рост преадаптированных к  $H_2O_2$  дрожжей *C. tropicalis* на сахарозе с подпиткой субстратом и внесением  $H_2O_2$  в ходе культивирования ( I ) в сравнении с ростом неадаптированных к  $H_2O_2$  дрожжей без внесения  $H_2O_2$  в среду культивирования ( II ).

1 – концентрация биомассы, опт. ед., I; 2 – концентрация биомассы, опт. ед., II; 3 – суммарное количество внесенной сахарозы, г/л, I, II; 4 – концентрация сахарозы, остаточная, г/л, I; 5 – концентрация сахарозы, остаточная, г/л, II.

В сравнительных экспериментах с высокоплотным культивированием без внесения и с внесением  $H_2O_2$  применительно к кормовым дрожжам р. *Candida*, преадаптированным к оксидативному стрессу, к концу контрольного эксперимента без внесения  $H_2O_2$  был достигнут уровень накопления биомассы дрожжей 130 г асв/л (170 усл. ед. опт. пл-ти, рис. 2, вариант II). Процесс был прекращен из-за ухудшения реологических свойств суспензии, при этом доля мертвых клеток в конце процесса достигла 10–30%.

В варианте с внесением  $H_2O_2$  доля мертвых клеток составляла не более 2–5%, при этом концентрация биомассы в среде достигала 145 г асв/л (190 усл. ед. опт. пл-ти, рис. 2, вариант I), т. е. практически максимально возможного предела, при котором все клетки в среде плотно упакованы, при этом не наблюдалось угасания окислительной активности дрожжей, снижалось остаточное содержание сахарозы в среде.

В режиме высокоплотного культивирования с подпиткой субстратом внесение  $H_2O_2$  в среду, вероятно, способствует поддержанию и восстановлению активного состояния клеток дрожжей *C. tropicalis* без проявления каких-либо признаков старения популяции и угасания их физиологической активности. Они более полно и с большей эффективностью утилизируют субстрат, нечувствительны к катаболитной репрессии субстратом, более устойчивы к таким стрессам, как голодание, высокая плотность популяции, осмотическое действие. Эти обстоятельства могут свидетельствовать в пользу предположения о сдвиге метаболизма дрожжей под действием  $H_2O_2$  и определенных регуляторных функций  $H_2O_2$ .

Оценки показали, что высокоплотное глубинное культивирование дрожжей в совокупности с оксидативным воздействием небольшими дозами пероксида водорода позволяет повысить интенсивность биосинтеза, конечную концентрацию биомассы дрожжей до 120–160 г/л по

сухому весу, выход биомассы дрожжей на 5–15%, содержание белка в биомассе на 7–10%, обеспечить 30–50%-ю экономию питательных солей, снизить количество сточных вод и концентрацию остаточных загрязнений в них в 5–10 раз, затраты на сырье и энергию на 15–20% по сравнению с периодическим режимом без подпитки.

Для получения положительного эффекта важно использовать оптимальные дозы стрессора, популяция должна быть преадаптирована к его воздействию, численность популяции, подвергаемой стрессорному воздействию, должна быть достаточно высокой, существенно физиологическое состояние популяции, концентрация субстрата. Эти результаты в последующем обусловили проведение целенаправленных исследований с изучением культивирования микроорганизмов с контролируемым оксидативным воздействием.

Как вариант ферментации с оксидативным воздействием были проведены эксперименты с дрожжами *S. tropicalis* СК4 с заменой воздействия  $H_2O_2$  на облучение ультрафиолетом ближнего УФ-диапазона. Заметное положительное действие УФ-облучения проявлялось для активно растущих культур микроорганизмов – в фазе экспоненциального роста, а также, когда плотность клеточной популяции превышала величины 0,5–1,0 г асд/л. При ферментации в биореакторе с облучением дрожжевой суспензии через выносную проточную кварцевую кювету и отслеживанием хода процесса по показанию датчика растворенного кислорода ( $pO_2$ ) была замечена существенная чувствительность хода кривой  $pO_2$  к условиям освещения содержимого биореактора. При его затемнении включение УФ-излучения вызывало у культуры переходное состояние, проявляющееся в замедлении падения  $pO_2$ , смены падения  $pO_2$  на рост, колебания в показаниях  $pO_2$ , т.е. отрицательно влияло на дыхательную активность. Переходный процесс длился 1–2,5 ч. Напротив, на фоне облучения среды ультрафиолетом освещение содержимого ферментера видимым светом ускоряло падение  $pO_2$ , т.е. положительно влияло на дыхательную активность суспензии дрожжей и скорость потребления кислорода, при этом отключение освещения видимым светом на фоне облучения среды ультрафиолетом вновь приводило к снижению дыхательной активности. Отключение УФ-облучения в условиях освещения содержимого ферментера видимым светом также приводило к замедлению дыхательной активности. В отсутствие УФ-облучения дрожжи были нечувствительны к воздействию видимого света. Отклик дрожжевой популяции на режимы и изменение облучения, определяемый непосредственно из кривой роста биомассы, в целом, коррелировал с характером изменения хода величины  $pO_2$ . Последующие эксперименты при постоянном действии ультрафиолета и/или света на всем протяжении цикла выращивания подтвердили возможность стимулирования. Для варианта выращивания дрожжей с облучением ультрафиолетом и светом наблюдалось повышение удельной скорости роста и конечного уровня накопления биомассы на 5–20% по сравнению с вариантом без облучения.

Изучение влияния таких факторов как концентрация посевного материала и субстрата, состояние посевного материала, интенсивность облучения, наличие светофильтров, отсекающих определенную часть спектра ультрафиолетового излучения, показало, что положительный эффект более явно выражен при уменьшении дозы инокулята, не зависит от состояния инокулята и интенсивности света выше порогового значения и сохраняется при повышении концентрации субстрата в среде. Интенсивное надпороговое воздействие УФ-излучения вызывает репрессию роста дрожжей независимо от того, освещается ли содержимое биореактора видимым светом или нет. Без видимого света ультрафиолет даже умеренной интенсивности (1 Вт/л) репрессирует рост дрожжей.

Полученные данные показали, что для того, чтобы гетеротрофные микроорганизмы (дрожжи) стали чувствительными к видимому свету, в том числе низкой интенсивности, они должны быть подвергнуты стрессовым воздействиям или находиться в состоянии стресса. При этом стрессовое состояние необязательно должно быть вызвано воздействием ультрафиолета, а например, такими факторами, как пероксид водорода, механическое действие (замораживание-размораживание). Таким образом, видимый свет на фоне действия ультрафиолета может выступать в качестве фактора, управляющего ростом клеток.

На основе результатов экспериментов был предложен новый метод воздействия на микроорганизмы для улучшения показателей ферментационного процесса. Метод предполагает одновременное воздействие на выращиваемую культуру видимого света и оптимальных доз ультрафиолета. Учитывая, что природное солнечное излучение, достигающее поверхности земли, имеет не только видимую, но и УФА и УФВ-составляющую, нами предложено назвать такой метод воздействия «солнечный биореактор».

Возникновение чувствительности к низкоэнергетическому воздействию видимого света интенсивностью 10–100 мВт/л у дрожжей, облучаемых мягким ультрафиолетом, можно объяснить действием фоторепарации с фотолиазой в качестве ключевого фермента, протекающей в дрожжевых клетках как один из механизмов противодействия стрессу. Фотолиаза является ключевым компонентом системы фоторепарации, реагирующей на свет в диапазонах 370–390 нм – для фотолиазы 1-го типа и 430–450 нм – для фотолиазы 2-го типа (Eker et al., 1986, 1994; Kim et al., 1993).

Нужно отметить, что реакция популяции дрожжей на действие мягкого УФА излучения и видимого света или пероксида водорода и видимого света во многом аналогична. Наряду с этим, возможно тесное пересечение стресс-ответов на определенных путях метаболизма и регуляции физиологического состояния клеток, подвергнутых воздействиям разных стрессов.

Обнаруженная нами новая возможность улучшения показателей микробной ферментации послужила основой для более широкого и целенаправленного исследования комбинированного воздействия стрессорных и антистрессорных факторов, воздействия факторов с оксидантной, прооксидантной и антиоксидантной активностями на различные системы биосинтеза и биологической очистки. Такой подход, в основе которого лежит совместное и целенаправленное действие оптимальных доз факторов оксидативного стресса и антистрессоров при определенном физиологическом состоянии популяции микроорганизмов, был назван нами управляемый или **контролируемый оксидативный стресс**.

В дальнейшем в исследованиях с микроорганизмами апробировались варианты контролируемого оксидативного воздействия с учетом различных сочетаний стрессорных и антистрессорных факторов с избирательным усилением или подавлением действия их на клетки микроорганизмов, а также выведением из ферментационной среды питательных компонентов и метаболитов с оксидантными и прооксидантными свойствами. Воздействие малых доз пероксида водорода (фактор с оксидантной активностью) и низких доз видимого света (может выступать как фактор с прооксидантной и одновременно с антиоксидантной активностью) является удобным, универсальным и эффективным технологическим приемом.

В исследованиях по культивированию дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (штаммы *S. cerevisiae* SL-100 и промышленный штамм *S. cerevisiae* Meyen T 985) изучалась возможность улучшения показателей этанольного брожения с использованием контролируемого оксидативного воздействия, а именно пероксида водорода и мягкого ультрафиолета на рост дрожжей при освещении и без освещения зоны ферментации видимым светом. В предварительных экспериментах было установлено, что эффект такого комплексного воздействия зависит от циклов пассирования к оксидативному стрессу, штамма, концентрации субстрата (сахарозы) и биомассы дрожжей, фазы роста, наличия или отсутствия аэрации. По мере пассирования к  $H_2O_2$  с первого по десятый пассаж растет устойчивость дрожжей к стрессору, причем в варианте пассирования с освещением среды устойчивость, уровень накопления биомассы и бродильная активность к пятому пассажи становятся выше даже по сравнению с контрольным вариантом без воздействия стрессора. При снятии такого воздействия устойчивость клеток к стрессу сохраняется лишь после первого пересева, на 2-ом пересеве она ухудшается и к 3-му пересеву без внесения  $H_2O_2$  рост культуры возвращается практически к уровню контроля. Одновременно с приобретением устойчивости к  $H_2O_2$  клетки становятся устойчивыми к более низкому рН, т.е. наблюдается перекрестная адаптация к рН шоку и оксидативному стрессу. Эффект адаптации проявляется в уменьшении числа мертвых клеток в конце фазы брожения (рис. 3), снижении остаточной концентрации сахара, повышении бродильной активности (рис. 4). Одновременно снижается бактериальная об-

семенность дрожжевой популяции. Действие мягкого ультрафиолета во многом аналогично действию пероксида водорода, при этом решающее значение для адаптации имеет фактор освещения. Достаточно рассеянного света с интенсивностью 40 мВт/л, чтобы восстановить жизнеспособность клеток. В полной темноте клетки не адаптируются ни к УФ, ни к  $H_2O_2$  и погибают. Свет в данном случае, также как и для дрожжей р. *Candida*, выступает как антистрессор, помогающий клеткам преодолевать последствия оксидативного воздействия, вероятно, через механизм фоторепарации.

Рассмотрение полученных результатов в совокупности с литературными данными позволило выдвинуть наиболее вероятное объяснение наблюдаемых положительных эффектов комбинированного действия стресс- и антистресс-факторов как сумму двух эффектов: с одной стороны, дерепрессия пентозофосфатного цикла и реакций конструктивного обмена в случае высоких концентраций углеводов в среде, с другой, нивелирование отрицательного последствия стресса под действием антистрессоров, в частности, системы фоторепарации, при этом повышенные содержание NADPH и активность пентозофосфатного цикла сохраняются.

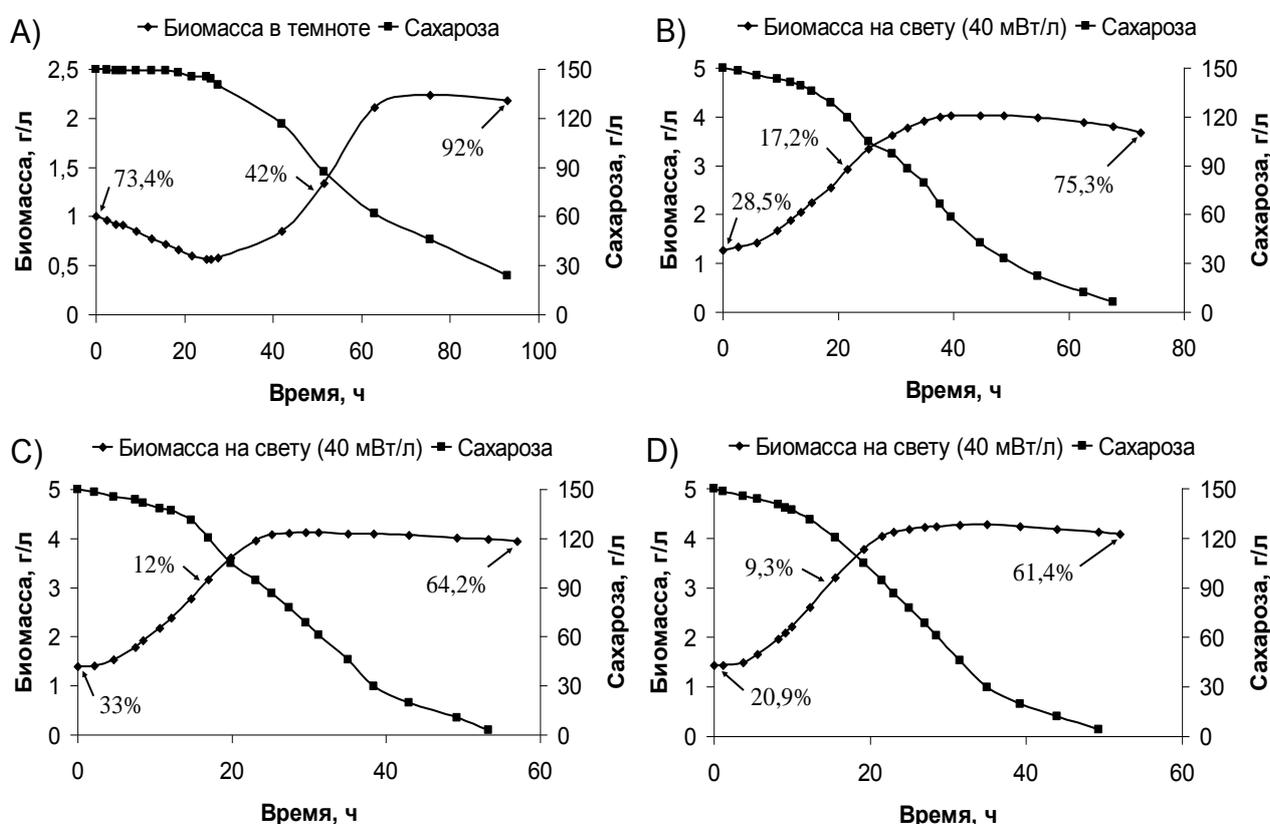


Рисунок 3 – Динамика накопления биомассы и потребления субстрата клетками штамма Meuep T 985 при анаэробном культивировании в биореакторе.

А – адаптированная культура (инокулят – линия 5-го пассажа), рост в темноте; В – контрольный вариант без оксидативного воздействия, рост на свету; С – адаптированная культура (инокулят – линия 5-го пассажа), рост на свету; D – адаптированная культура (инокулят – линия 10-го пассажа), рост на свету.

Цифрами у стрелок указана доля мертвых клеток.

В анаэробных условиях культивирования эти физиологические изменения могут неоднозначно влиять на рост и бродильную активность дрожжей. Конечный результат будет определяться лимитирующим фактором. С одной стороны, если лимитирование определяется жизнеспособностью клеток, их физиологической активностью, то повышение этих показателей может способствовать и повышению бродильной активности в условиях анаэробноза. С другой стороны, как следует из данных литературы, внесение пероксида водорода репрессирует в первую

очередь гликолиз и если лимитирующей стадией брожения является именно гликолиз, то в анаэробных условиях следует ожидать подавления бродильной активности в адаптированных линиях дрожжей. Результаты экспериментов со штаммами T 985 и SL-100, адаптированными к  $H_2O_2$ , показали, что бродильная активность адаптированных линий дрожжей может быть выше, т.е. более важен фактор поддержания высокой доли жизнеспособных клеток в популяции и их физиологической активности.

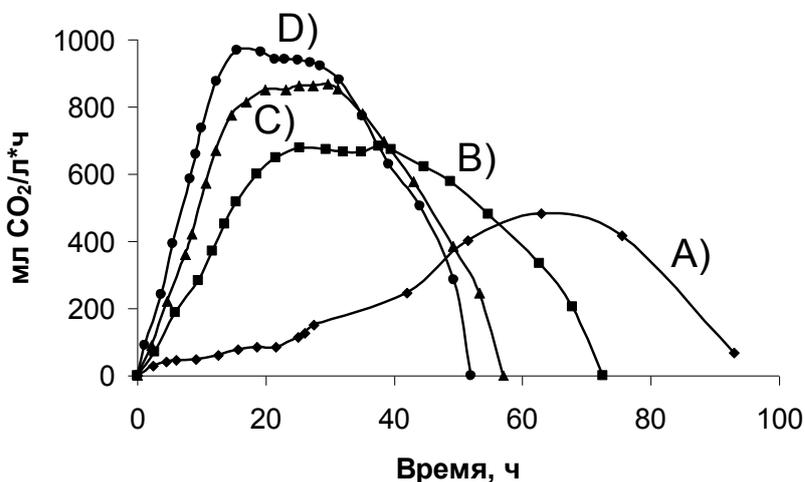


Рисунок 4 – Бродильная активность при анаэробном культивировании штамма сахаромецетов Meulen T 985 в биореакторе.

А – адаптированная культура (инокулят – линия 5-го пассажа), брожение в темноте; В – контрольный вариант без оксидативного воздействия, брожение на свету; С – адаптированная культура (инокулят – линия 5-го пассажа), брожение на свету; D – адаптированная культура (инокулят – линия 10-го пассажа), брожение на свету.

Проведенные исследования позволили предложить новый способ ведения процесса спиртового брожения. Оценки показывают, что обработка дрожжей малыми дозами  $H_2O_2$  и видимого света низкой интенсивности по предложенному способу позволит поддерживать их высокую физиологическую активность, повысить удельную скорость роста дрожжей, бродильную активность на 10–40%, выход этанола на 2–5%, сократить время брожения в периодических условиях на 30%, время приготовления маточной культуры в 2–3 раза, снизить суммарное содержание примесей в сброженном сусле в 1,5–3 раза. При этом повышается устойчивость дрожжей к закислению среды, дольше сохраняется физиологическая активность клеток и продуктивность биореактора, снижается общая обсемененность. Способ может найти применение в спиртовом производстве при получении пищевого и технического этанола.

Положительные эффекты при контролируемом оксидативном воздействии наблюдались и при культивировании молочнокислых бактерий. В качестве основного приема изучалось комбинированное воздействие малых доз пероксида водорода и видимого света с использованием популяции штамма-продуцента *L. paracasei* B4079, адаптируемой к воздействию  $H_2O_2$ .

Освещение являлось значимым фактором в процедуре адаптации к стрессору и при последующем культивировании бактерий с получением молочной кислоты. На свету молочнокислые бактерии адаптировались к действию  $H_2O_2$ , накапливали существенно больше биомассы, чем в контроле, повышалось количество жизнеспособных клеток, более полно потреблялись компоненты питания и меньше образовывалось побочных продуктов жизнедеятельности, увеличивался выход молочной кислоты на 2–5% с приближением к почти 100% уровню конверсии глюкозы в молочную кислоту. В контрольных вариантах, без оксидативного воздействия, освещение не играло существенной роли.

На рис. 5 представлены результаты культивирования в биореакторе (Minifors,  $V_{\text{раб.}}$  3 л) в условиях оксидативного стресса с освещением (средняя освещенность на поверхности обечайки ферментера – 10800 Лк) и затемнением ферментационной среды. В данном случае среда с компонентами питания и добавленными 0,3 г/л пероксида водорода предварительно выдерживалась в стерильных условиях в течение 24 час на свету, после чего вносился инокулят (выращенная на среде MRS адаптированная культура 22 пассажа). Видно, что при использовании преадаптированной к внесению  $\text{H}_2\text{O}_2$  линии и затемнении ферментационной среды наблюдается существенное торможение роста и биосинтеза молочной кислоты – до 30 час включительно по сравнению с ростом на свету. Это свидетельствует в пользу того, что эффект обусловлен не модификацией питательной среды в результате протекания каких-либо химических или фотохимических реакций окисления, а связан именно с биологическими фоточувствительными процессами.

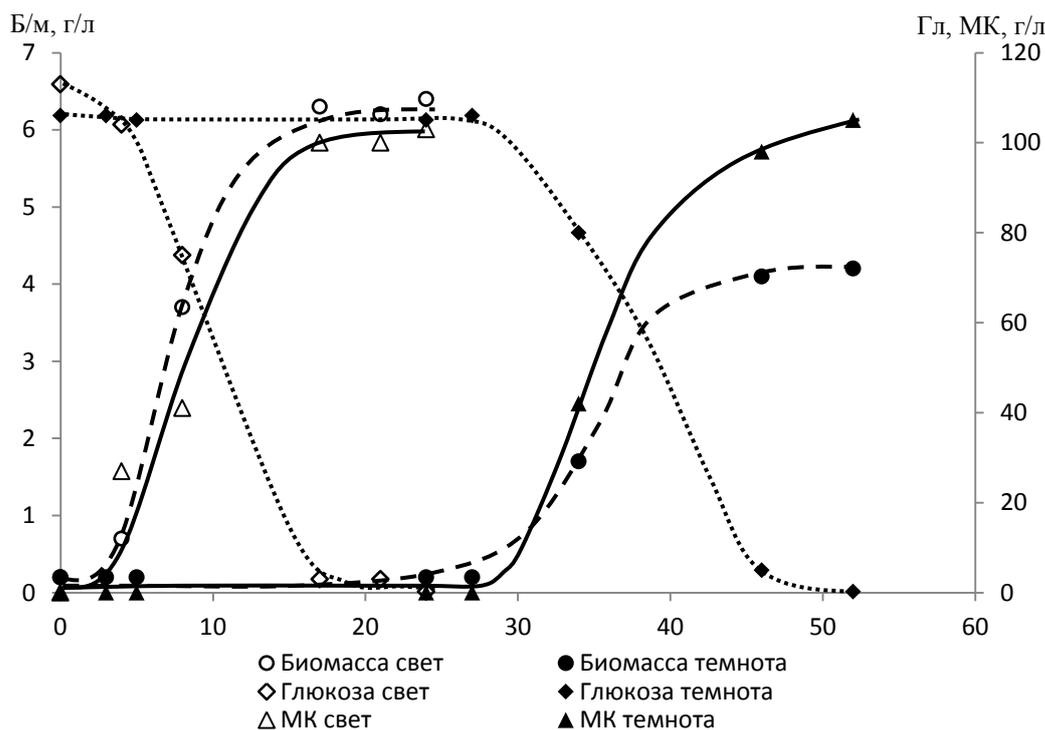


Рисунок 5 – Накопление биомассы, потребление глюкозы и накопление молочной кислоты при культивировании стрессированной линии на свету и в темноте в условиях предварительного суточного выдерживания питательной среды на свету с пероксидом водорода. Точка «0» на оси абсцисс соответствует моменту внесения инокулята.

Сопоставление УФ-спектров водных растворов  $\text{H}_2\text{O}_2$ , растворов  $\text{H}_2\text{O}_2$  с компонентами питательной среды показало отсутствие сколь-нибудь существенных реакций химического окисления последних пероксидом водорода.

Культура молочнокислых бактерий, преадаптированная к стрессовому воздействию пероксида водорода на свету, становилась более устойчивой и к сублетальному температурному воздействию, что свидетельствует о «перекрестной адаптации» и участии фоточувствительных процессов при ответе на оксидативный стресс и тепловой шок.

Возникновение именно такого сочетания перекрестной адаптации к стрессовым воздействиям можно объяснить, как и в случае с дрожжами рр. *Saccharomyces* и *Candida*, экологическими условиями обитания молочнокислых бактерий, а именно в одной из экологических ниш – на поверхности растений (в эпифитной зоне). В такой природной экологической нише преимущество получают те молочнокислые бактерии, которые могут использовать свет (фоторепарацию) для устранения повреждающих воздействий АФК, и одновременно устойчивые к тепловому воздействию.

Наличие перекрестной адаптации к различным видам стресса расширяет возможности управляемого культивирования микроорганизмов, поддержания целевой физиологической и биохимической активности продуцента при отклонении режимов культивирования от регламентных.

Исследования по культивированию продуцента *L. paracasei* В4079 показали, что контролируемое оксидативное воздействие может быть одним из вариантов дальнейшего совершенствования процесса молочнокислого брожения, в том числе в мембранном биореакторе.

В экспериментах с **галобактериями** отправной точкой исследований являлось выяснение управляющих факторов, влияющих на выработку бактериородопсина (БР) при культивировании галобактерий. Учитывая положительные результаты, полученные при культивировании дрожжей в условиях контролируемого оксидативного воздействия, основное внимание акцентировали на возможной важной роли стрессовых воздействий и ответа на стрессы в жизнедеятельности и метаболизме галобактерий.

В работе использовались штаммы галобактерий *Halobacterium salinarum*, продуцирующие наиболее существенное количество бактериородопсина среди экстремальных галофилов.

В качестве исходных использовались штамм *Halobacterium salinarum* ET 1001, его мутанты 353П (клетки окрашены в оранжевый цвет), ST-033 (клетки окрашены в сиреневый цвет). Все штаммы были предоставлены Д.А. Складневым (ГосНИИГенетика, г. Москва).

У галобактерий биосинтез может быть направлен по нескольким относительно устойчивым путям, в частности, по каротинсинтезирующему и по бактериородопсинсинтезирующему путям. При преобладании первого пути колонии клеток галобактерий окрашены в оранжевый цвет, при преобладании второго пути – имеют сиреневый оттенок. Штамм ET 1001, из которого были получены мутанты 353П и ST-033, характеризуется пониженным содержанием каротиноидов при достаточно высоком уровне накопления БР – около 45 мг/л, что облегчает выделение пурпурных мембран и БР.

В дальнейшем стандартным методом индуцированного мутагенеза с облучением суспензии клеток жестким ультрафиолетом ( $\lambda=254$  нм) был получен ряд штаммов с разной окраской, из которых штамм UM-17 с колониями пурпурного цвета при росте на агаризованной среде показал наибольшую способность к синтезу БР в качалочных колбах при приемлемых ростовых характеристиках с накоплением бактериородопсина 70–75 мг/л, что в 1,6–1,8 раз больше, чем исходный штамм ST-033. Штамм UM-17 не расщеплялся на разноокрашенные клоны при пересеве.

С исходными и полученными штаммами была проведена серия экспериментов, в которой выявлялись основные факторы, определяющие активность культуры галобактерий в отношении синтеза бактериородопсина. Определяли наиболее подходящие условия роста галобактерий и синтеза БР, прежде всего такие наиболее очевидные для ферментации, как состав питательной среды, pH, интенсивность аэрации, освещенность. Исследования показали, что по значимости влияния на рост галобактерий и накопление БР экологические и биологические факторы могут быть ранжированы следующим образом (в порядке убывания значимости): особенности штамма > интенсивность аэрации  $\approx$  продукты перекисного окисления компонентов среды > состав триптонов или пептонов, входящих в питательную среду > уровень освещения  $\approx$  доза посевного материала > ингибиторы метаболизма, накапливающиеся в процессе жизнедеятельности галобактерий > фаза роста посевного материала  $\approx$  состав дрожжевых экстрактов, входящих в питательную среду. В наиболее подходящих условиях суспензия клеток приобретала сиреневую окраску, на спектре лизата исчезали пики каротиноидов и оставался лишь один пик бактериородопсина.

Рост галобактерий и синтез БР сильно зависели от марки пептонов и триптонов, используемых в качестве ростовых факторов. Также было установлено, что с возрастанием времени хранения питательной среды после ее приготовления показатели роста и биосинтеза существенно падают. На среде, хранящейся свыше 2 сут. после ее приготовления, особенно на свету и при аэрации, галобактерии растут медленно и синтезируют мало БР, что можно связать с накоплением в среде продуктов окисления. Очевидно аналогичные, но более интенсивные процессы старе-

ния среды могут протекать и в ходе культивирования галобактерий (5–7 суток культивирования при температуре 37–38 °С и аэрации).

Выявленные закономерности позволили предположить, что для разработки технологически рациональных способов культивирования галобактерий целесообразно использовать такие приемы, которые снижают содержание продуктов фотохимического и химического окисления (в частности, перекисей, активных форм кислорода) в среде, нивелируют воздействие этих факторов оксидативного стресса, т.е. разработать способы культивирования галобактерий в условиях контролируемого оксидативного воздействия.

Основываясь на полученных данных о негативном воздействии образующихся ингибиторов биосинтеза, были апробированы методы культивирования штамма UM-17 как в колбах, так и в биореакторе, минимизирующих отрицательное действие. Использовались следующие подходы: 1) подготовка посевного материала; 2) культивирование с доливом; 3) внесение антиоксидантов; 4) – подбор условий освещения (стимулирование выработки БР при одновременном уменьшении фотохимического воздействия на среду); 5) селективное извлечение ингибиторов сорбентом в процессе роста.

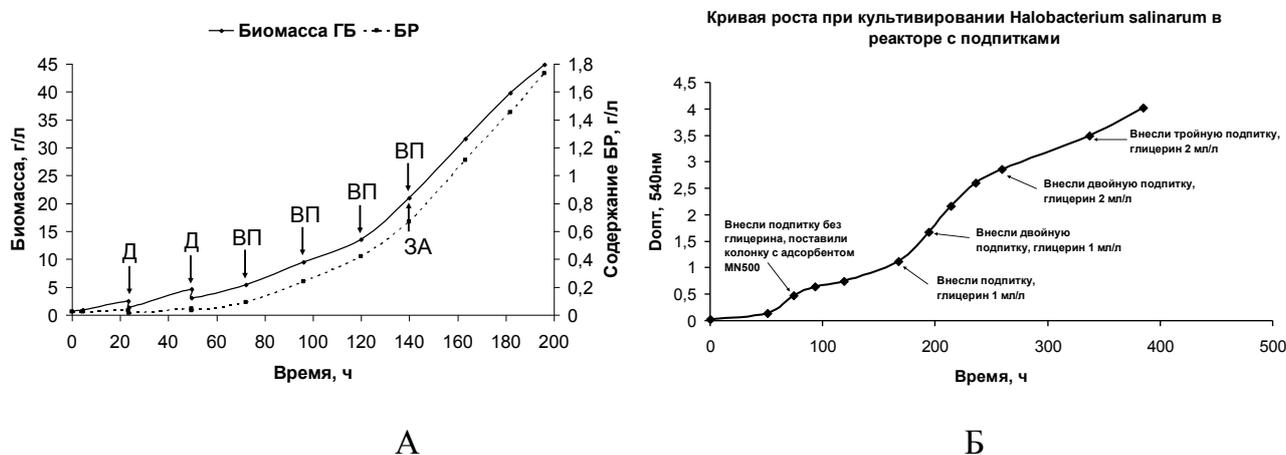


Рисунок 6 – Накопление биомассы при выращивании штамма UM-17 в биореакторе с прокачкой ферментационной суспензии через выносной контур с емкостью с сорбентом для извлечения ингибиторов биосинтеза, доливом свежеприготовленной питательной среды в биореактор и внесением подпиток. Д – долив среды, ВП – внесение субстратной подпитки, ЗА – замена адсорбента. А – с инкапсулированным в агар углем АГ-3; Б – с катионитом Purolite MN500 в Na<sup>+</sup>-форме.

Наилучшие результаты были получены при культивировании в биореакторе с использованием инкапсулированного в агар угля АГ-3 или катионита Purolite MN500 (рис. 6), очевидно, поглощающих из питательной среды неидентифицированные ингибиторы метаболизма. При использовании катионита MN500 не требуется инкапсулирования адсорбентов, что является важным технологическим преимуществом. Можно стерилизовать питательную среду вместе с адсорбентом. Отработанный адсорбент Purolite MN500 восстанавливает свою способность поглощать ингибиторы биосинтеза после регенерации.

При использовании гранулированного адсорбента АГ-3 по истечении 8 сут. удалось достичь конечного уровня накопления биомассы 45 г/л (по сухому веществу) при суммарном содержании бактериородопсина 1700–1750 мг/л. В варианте с катионитом MN500 к концу культивирования накапливалось биомассы – 20 г/л, БР – 430 мг/л.

В спектре лизата биомассы галобактерий, накопленной в конце ферментации, практически полностью отсутствовали пики каротиноидов и проявлялся только ярко выраженный пик БР, что в дальнейшем позволяет существенно облегчить выделение БР из биомассы, очистку его от каротиноидов и обеспечить получение относительно недорогих препаратов БР. Одновременно более чем в 2 раза снижается расход органического субстрата на 1 г бактериородопсина. Реализация

ферментационного процесса по такому высокоплотностному режиму снижает и количество жидких отходов – отработанной культуральной жидкости.

Полученные образцы биомассы в различных опытах содержали 2–4% БР с минимальным содержанием каротиноидов в биомассе.

Результаты исследований с галобактериями подтвердили важность контроля стрессового и антистрессового воздействия веществ – оксидантов, прооксидантов и антиоксидантов в процессах микробиологического синтеза. Разработанный способ культивирования галобактерий ферментацией с адсорбентом не имеет мировых аналогов и позволяет за один цикл в 10–15 раз увеличить накопление биомассы ГБ, в 25–30 раз выработку ими БР и производительность биореактора в целом. Способ обеспечивает устойчивость физиологической и биосинтетической активности штамма-продуцента, стабильность процесса, минимальное содержание каротиноидов в биомассе, что значительно упрощает технологию выделения бактериородопсина при одновременном сокращении ферментационных стоков (в виде отработанной культуральной жидкости) и без существенного увеличения длительности ферментационного цикла. Техничко-экономическая оценка показала, что себестоимость бактериородопсина (в составе пурпурных мембран) можно снизить с 700–14000 руб. за 1 мг (в зависимости от чистоты продукта и масштабов производства) до 1–8 руб. за 1 мг, т.е. в 90–1700 раз. Другое преимущество организации выпуска биомассы галобактерий и бактериородопсина при реализации разработки в промышленных масштабах – уменьшение количества жидких стоков (в виде отработанной культуральной жидкости).

Разработанная малозатратная ресурсосберегающая и экологически чистая технология культивирования галобактерий и выделения бактериородопсина в составе пурпурных мембран позволяет получать образцы пурпурных мембран высокого качества. Образцы ПМ с БР были переданы в ИБХ, МГУ, Институт биофизики в Пущино для создания пленок на их базе.

В экспериментах с **продуцентами рибофлавина** изучалась возможность применения контролируемого оксидативного стресса к рекомбинантным штаммам микроорганизмов для повышения показателей биосинтеза.

Типично, без создания селективных условий отбора, все рекомбинантные продуценты теряют свою целевую активность по мере роста популяции из-за нестабильности внедренных в геном конструкций. Процедура же использования контролируемого оксидативного воздействия предусматривает преадаптацию продуцента к стресс-факторам путем последовательного пассирования. Поэтому на примере рекомбинантных продуцентов рибофлавина интересно было посмотреть, во-первых, насколько быстро будет падать биосинтетическая активность продуцента по ходу пассирования и роста на питательной среде без стрессорного воздействия и в условиях адаптации к оксидативному стрессу. Во-вторых, интерес представляла апробация варианта контролируемого оксидативного воздействия с внесением  $H_2O_2$  на фоне освещения среды видимым светом, учитывая, что избыточное количество накапливаемого во внеклеточной среде рибофлавина, как фотосенсибилизатора и прооксиданта, может оказывать токсичное действие на клетки продуцента в условиях аэрации ферментационной среды и ее освещения видимым светом. Наряду с этим, возможно и двойственное действие света: антистрессорное через фоторепарацию и стрессорное через фотоокисление рибофлавина.

Исследования с бациллярными трансформантами по синтезу **рибофлавина** *B. subtilis* В-52 и *B. subtilis* Y51/pMX45 №18/4 показали, что воздействие света на штаммы всех протестированных продуцентов рибофлавина и интенсивная аэрация вызывали отрицательный эффект «старения» питательной среды и угнетали рост бактерий; воздействие же пероксида водорода по мере пассирования увеличивало выход накапливаемой биомассы как при росте на свету, так и при росте в темноте. Изменения на уровне физиологического ответа в результате адаптации к воздействию стресс-факторов носят обратимый характер. По мере пересевов во всех случаях наблюдалось резкое падение накопления рибофлавина. Причинами этого являются: 1) реверсия к прототрофу; 2) прооксидантное действие рибофлавина из-за образования АФК вследствие его окисления и фотосенсибилизации. Реверсия к прототрофу и внутривнутрипопуляционная изменчивость могут суще-

ственно ускоряться при оксидативном стрессе, характерном для аэробных условий культивирования и обусловленным присутствием активных форм кислорода, а также при наличии в среде компонентов с оксидантной и прооксидантной активностями, что, в свою очередь, ведет к ускорению потери целевой биосинтетической активности.

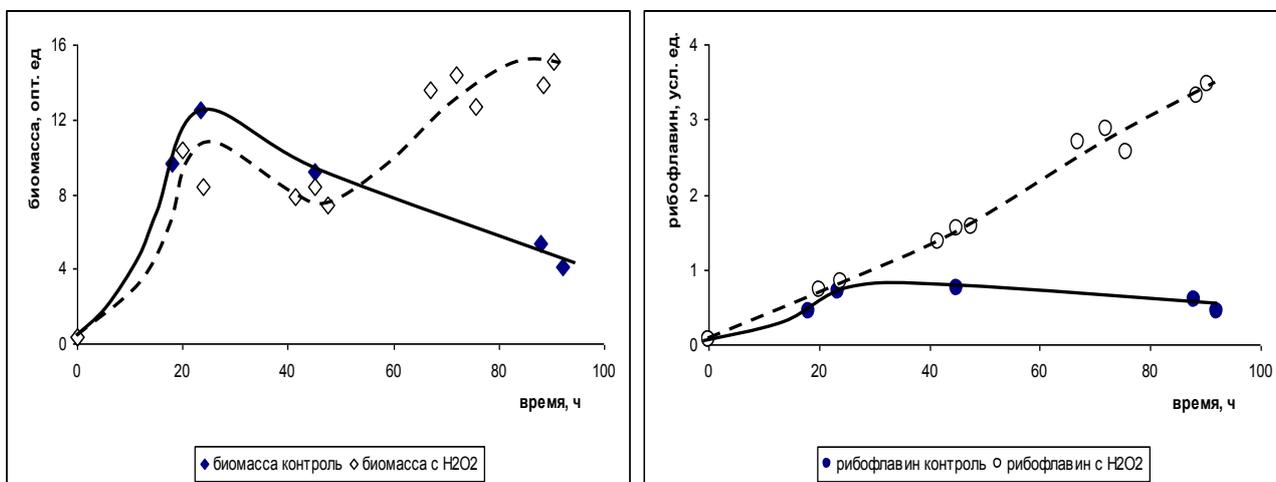


Рисунок 7 – Изменение показателей роста и биосинтеза при культивировании в биореакторе в режиме с подпиткой субстратом линий штамма *B. subtilis* В-52 и освещения видимым светом.

Вместе с тем, в условиях оксидативного стресса ускорение микроэволюционного процесса может компенсироваться повышением устойчивости субпопуляций к агентам оксидативного воздействия. Управление процессом культивирования с минимизацией образования АФК при поддержании подходящих параметров культивирования –  $pO_2$  на уровне 10–20% от насыщения, умеренная удельная величина вводимой энергии видимого света, подпитка субстратом в ходе ферментации (рис. 7), применение антистрессоров – факторов, нивелирующих действие стрессоров, в частности с антиоксидантной активностью, может замедлить скорость микроэволюции и повысить устойчивость заданных свойств популяции.

Эксперименты с рекомбинантными штаммами показали возможность совершенствования процесса управляемого культивирования и биосинтеза рибофлавина путем рационального сочетания стрессорных и антистрессорных воздействий на популяцию продуцентов, при этом положительный эффект может достигаться за счет снижения скорости реверсии рекомбинантного штамма к прототрофным вариантам, а также снижения фотосенсибилизирующего и прооксидантного угнетающего действия накапливаемого рибофлавина и продуктов окисления компонентов питательной среды на клетки продуцента, наиболее заметного в условиях интенсивных аэрации и освещения ферментационной среды. Все это создает научную основу для целенаправленной разработки методов управляемого культивирования рекомбинантных продуцентов.

**В шестой главе** приведены результаты экспериментов по биологической очистке сточных вод с оксидативным стрессовым воздействием.

Эксперименты с биологической очисткой стока солодовни были начаты по инициативе фирмы «Энви́ро-Хеми ГМБХ» (ФРГ), столкнувшейся с проблемой неудовлетворительной работы очистных сооружений, построенных по проекту фирмы для ряда отечественных солодовен.

Пуск и эксплуатация построенных очистных сооружений солодовен показали, что их сточные воды крайне сложно поддаются биологической очистке. При требуемых нормативах очистки по ХПК<sub>вых.</sub> 30 мг/л сооружения снижают ХПК<sub>вых.</sub> в лучшем случае лишь до 80–120 мг/л. Активный ил (АИ) в аэротенке склонен к вспуханию, пенообразованию, плохо отделяется во вторичных отстойниках. Использование таких мер как внесение биогенных элементов, коагулянта, биопрепаратов, изменение условий аэрации, возраста ила не привели к кардинальному улучшению качества

очищенной воды. В этой связи было решено апробировать метод биологической очистки с внесением  $H_2O_2$ , с учетом фактора освещения среды.

В лабораторных экспериментах был получен активный ил, адаптированный к пероксиду водорода в условиях освещения среды. При очистке периодическим способом по ходу возрастания числа пассажей наблюдалась тенденция повышения уровня и скорости накопления биомассы и степени очистки в варианте с внесением  $H_2O_2$  относительно контроля, при этом в вариантах с внесением  $H_2O_2$  наблюдалось увеличение скорости окисления органических загрязнений (по ХПК) и снижение остаточного содержания ХПК в 1,5–3 раза по сравнению с контролем.

В аналогичных экспериментах с модельным стоком солодовни с очисткой в проточном режиме в лабораторном аэротенке с вторичным отстойником и полным рециклом осевшего в отстойнике активного ила, проведенных на протяжении полутора лет, в стабильном состоянии без внесения  $H_2O_2$  содержание ХПК падало с 400–1000 мг/л (на входе) до 150–250 мг/л (на выходе). Внесение же  $H_2O_2$  малыми дозами при оптимальном освещении приводило к падению ХПК на выходе до 10–100 мг/л. Положительное действие  $H_2O_2$  и видимого света проявлялось и в изменении содержания взвешенных веществ в выходящей из реактора воде. При  $XPK_{вх.}$  3000–4000 мг/л и времени пребывания среды в системе около 3 сут. добавление пероксида водорода в оптимальных дозах, как правило, приводило к падению  $XPK_{вых.}$  от 2 до 4 раз. При прекращении подачи  $H_2O_2$  на длительное время, 2 нед. и более, наблюдалось возрастание  $XPK_{вых.}$

Эксперименты показали, что при стандартных режимах работы аэротенка для обеспечения снижения  $XPK_{вых.}$  на всем протяжении очистки достаточно вносить  $H_2O_2$  в среду через каждые 3–5 сут., порциями в оптимальных дозах 10–20 мг/л, т.е. с учетом притока среды в систему среднесуточно примерно 3–7 мг/л на суммарный объем среды, находящейся в аэротенке с вторичным отстойником и поступившей в систему за 3–5 сут.

Независимо от режима освещения и внесения  $H_2O_2$  использованная система с полной рециркуляцией ила устойчиво функционировала при нагрузках по  $XPK_{вх.}$  до 750–800 мг/л.сут. (рис. 8).

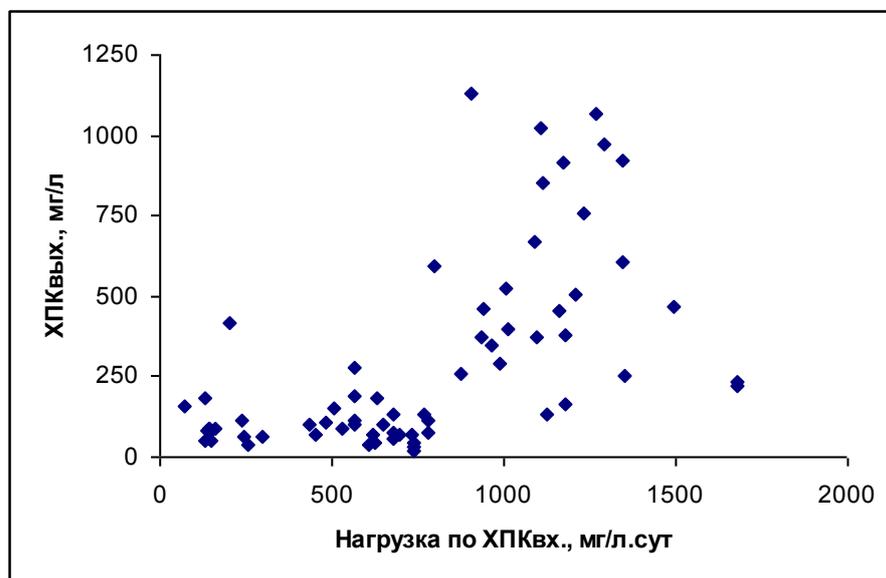


Рисунок 8 – Изменение  $XPK_{вых.}$  в зависимости от нагрузки по  $XPK_{вх.}$  в лабораторном аэротенке с полным рециклом активного ила и окислительным воздействием.

В табл. 2 приведены обобщенные результаты очистки (по изменению ХПК) в экспериментах с модельным стоком при освещении среды с интенсивностью 7–3500 Лк (0,5–250 мВт/л). Повышение качества очистки проявляется во всех режимах: при различных способах очистки, нагрузках, содержании загрязнений (ХПК, биогенных элементов) в исходной воде, температурах, режимах внесения

$H_2O_2$ . Эффект относительно малых доз  $H_2O_2$  на фоне воздействия низкоинтенсивного видимого света в отношении повышения качества очистки свидетельствует не о непосредственном химическом воздействии пероксида водорода на загрязнения, а о регуляторной, физиологической роли комбинированного воздействия  $H_2O_2$  и видимого света.

Таблица 2 – Показатели очистки в экспериментах с модельным стоком

| Условия очистки   | Без внесения $H_2O_2$ |               | С внесением $H_2O_2$ и освещением среды |               |
|---|-----------------------|---------------|---|---------------|
|   | ХПК на входе          | ХПК на выходе | ХПК на входе                            | ХПК на выходе |
| Время пребывания среды 1 сут., суточная доза $H_2O_2$ 15–20 мг/л  | 700–900               | 100–140       | 700–900                                 | <10–50        |
| Время пребывания среды 2 сут., суточная доза $H_2O_2$ 80–100 мг/л | 400–500               | 100–120       | 420                                     | 30–70         |
|   | 1000–1300             | 230–260       | 1000–1300                               | 10–110        |
| Время пребывания среды 2 сут., суточная доза $H_2O_2$ 15–20 мг/л  | 1300–1600             | 140–230       | 1300–1600                               | 40–130        |
| Время пребывания среды 3 сут., суточная доза $H_2O_2$ 2–3 мг/л    | 700–900               | 70–90         | 700–900                                 | <10–30        |
| Время пребывания среды 3 сут., суточная доза $H_2O_2$ 10–15 мг/л  | 3000–4000             | 750–900       | 3000–4000                               | 250–450       |
| Время пребывания среды 9 сут., суточная доза $H_2O_2$ 7–14 мг/л   | 1100–1400             | 110–320       | 1050                                    | <10–150       |

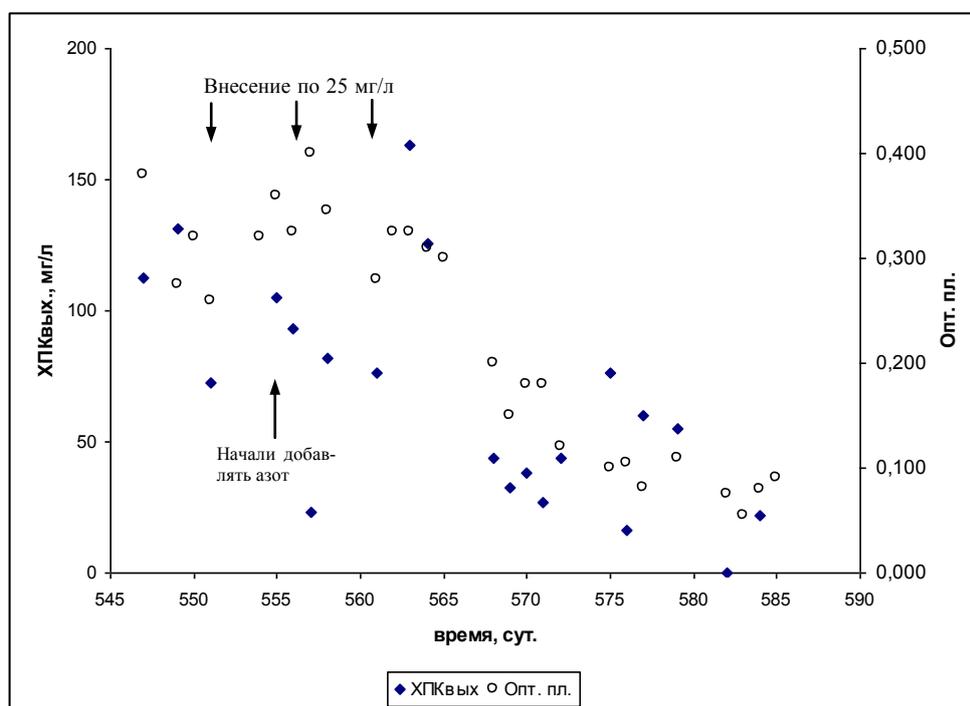


Рисунок 9 – Изменение  $XPK_{\text{вых.}}$  на выходе после добавления в среду требуемого количества аммонийного азота.

$XPK_{\text{вх.}}$  – 1600–1800 мг/л;  $N-NH_4^+$  – 30 мг/л; время пребывания среды в системе около 2 сут.; освещение 5–10 Лк (0,5–1 мВт/л); температура 25–28 °С.

Представленные результаты были получены с модельной средой, обедненной биогенными элементами. Без внесения минеральных солей содержание фосфатов на всем протяжении эксперимента в воде на выходе из системы не превышало 0,02 мг/л,  $\text{NH}_4^+$  – не более 0,05 мг/л,  $\text{NO}_2^-$  – не более 0,02 мг/л,  $\text{NO}_3^-$  – не более 1,5 мг/л. Внесение же в подаваемую среду с ХПК<sub>вх.</sub> 1600–1800 мг/л дополнительно 30 мг/л аммонийного азота обеспечивало стабильное снижение ХПК до 5–40 мг/л (рис. 9), т.е. степень удаления ХПК достигает 97,5–99,7%, что является очень высоким показателем для одностадийного проточного процесса биологической очистки, без накопления больших масс избыточного ила, с устойчивым функционированием при подаче на вход воды с ХПК<sub>вх.</sub> до 2000 мг/л, нагрузках по ХПК<sub>вх.</sub> до 750–800 мг/л.сут. без возникновения проблем образования пены и вспухания ила. Ил, присутствующий в системе, хорошо фильтруется и легко отдает воду. Обладая такими показателями, разработанный способ может быть отнесен к наилучшему из существующих на сегодня способов одностадийной аэробной биологической очистки. Он может быть использован для глубокой биологической очистки сточных вод промышленных предприятий и хозяйственно-бытовых стоков с обеспечением соответствующих нормативных требований к содержанию органических загрязнений в очищенной воде при уровнях загрязнения сточной воды по ХПК до 1500–2000 мг/л и нагрузках по ХПК<sub>вх.</sub> до 1000 мг/л.сут.

Таким образом, исследования, проведенные с модельным стоком пивоварения, выявили новую принципиальную возможность совершенствования процессов биологической очистки сточных вод с использованием комплексного воздействия на основе концепции «контролируемого оксидативного стресса», а именно с внесением пероксида водорода, использованием активного ила, адаптированного к  $\text{H}_2\text{O}_2$ , и освещением среды видимым светом низкой интенсивности, в частности, с целью снижения остаточного ХПК в воде и достижения нормативных требований к очистке, действующих в Российской Федерации.

Полученные данные указывают на возможность создания замкнутой системы аэробной очистки в проточных условиях с полным рециклом ила с типичной нагрузкой по ХПК<sub>вх.</sub> 500–2000 мг/л.сут., в которой для повышения эффективности очистки используется комбинированное воздействие низких доз  $\text{H}_2\text{O}_2$  (4–15 мг/л.сут.) и низкоинтенсивного видимого света (0,5–10 мВт/л), при этом степень очистки сточных вод может достигать 99% в одностадийном биологическом процессе, т.е. при ХПК<sub>вх.</sub> 500–1000 мг/л ХПК на выходе из очистной системы может составить 10 мг/л. В процессе биологической очистки можно получить воду с полной нитрификацией аммонийного азота.

При ХПК сточной воды на входе 5000–7000 мг/л показатели очистки по ХПК<sub>вых</sub> не выше 10 мг/л могут быть достигнуты в двухступенчатой системе с удалением 75–95% загрязнений на первой, анаэробной стадии в реакторах с гранулированным илом (UASB и др.) с последующей доочисткой стоков на второй, аэробной стадии с использованием контролируемого оксидативного воздействия.

Улучшение показателей биологической очистки сточных вод при оптимальном оксидативном воздействии пероксидом водорода наблюдалось в экспериментах с биоокислением фенола в модельных стоках с дрожжевым и бактериальным ценозами, полученными в диссертационной работе в результате длительной (более 1,5 лет) адаптации к внесению  $\text{H}_2\text{O}_2$  (в концентрации до 2% об.  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) и фенолу (в концентрации до 5 г/л в «fed-batch» режиме подпитки субстратом). В условиях хемостата с содержанием фенола в подаваемой среде 1,8 г/л,  $\text{H}_2\text{O}_2$  – до 0,4 г/л окислительная мощность по фенолу была выше на 50%, чем в тех же условиях без добавления  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Бактериальный консорциум микроорганизмов при содержании фенола в среде на входе 1,8 г/л выдерживал до 3 г/л  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Окислительная мощность по фенолу для бактериального ценоза, адаптированного к  $\text{H}_2\text{O}_2$ , была выше на 80% по сравнению с вариантом без внесения  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Для обоих ценозов наблюдалось снижение остаточных концентраций фенола до 0,01 г/л на выходе из биореактора при внесении пероксида водорода, примерно в 10 раз ниже по сравнению с вариантом проточной очистки без внесения  $\text{H}_2\text{O}_2$ . В табл. 3 приведены сравнительные показатели изученных режимов деструкции фенола.

Таблица 3 – Сравнительные показатели деструкции фенола при различных режимах культивирования

| Показатели  | Процесс без внесения $H_2O_2$ |           | «Гибридный» процесс с внесением $H_2O_2$ |           |                           |
|---|-------------------------------|-----------|--|-----------|---------------------------|
|   | периодический                 | проточный | периодический                            | проточный | периодический с подпиткой |
| $C_{\text{фенола}}$ , г/л, вход.  | 2,0                           | 3,0       | 2,0                                      | 2,0       | до 100 г/л за 1 цикл      |
| $C_{\text{фенола}}$ , г/л, выход.   | <0,01                         | >0,1      | <0,01                                    | <0,01     | <0,05                     |
| Проток, $ч^{-1}$  |                               | 0,042     |  | 0,12      |                           |
| Окислительная мощность, г/л.ч   | 0,06                          | 0,12      | 0,09                                     | 0,22      | ~ 1,0                     |
| Степень деструкции фенола, %  | >99,4                         | <96,7     | >99,4                                    | >99,4     | >99,95                    |
| Концентрация активного ила в конце процесса деструкции, г/л по сух. веществам | 0,6                           |           |  |           | 17,0                      |
| Выход ила от фенола, г/г  | 0,3                           |           |  |           | 0,17                      |

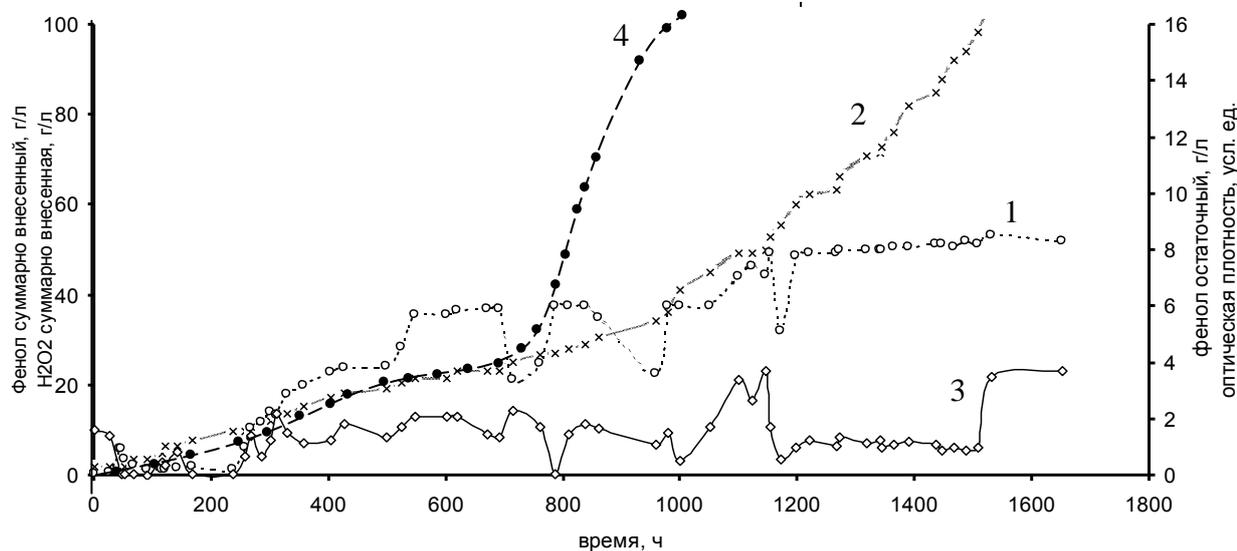


Рисунок 10 – Показатели окисления фенола в режиме культивирования с подпиткой с использованием биоценоза на основе дрожжей, преадаптированного к пероксиду водорода.

1 – оптическая плотность, усл. ед.; 2 – суммарное количество внесенного фенола, г/л; 3 – концентрация фенола, остаточная, г/л; 4 – количество суммарно внесенного пероксида водорода, г/л.

При биодеструкции с подпиткой фенолом и внесением пероксида водорода, аналогично тому, как это проводилось в экспериментах с высокоплотным культивированием дрожжей *S. tropicalis* с подпиткой сахарозой (см. рис. 2), в контрольных экспериментах с неадаптированным к пероксиду водорода дрожжевым консорциумом фенолдеструкторов с дробным внесением фенола порциями по 0,5–1 г/л и без внесения  $H_2O_2$  разложение фенола останавливалось уже после суммарного внесения 4–6 г фенола на 1 л среды. Однако в аналогичных экспериментах с дрожжевым консорциумом, адаптированным к  $H_2O_2$ , с внесением фенола порциями по 0,5–5,0 г/л и  $H_2O_2$  в количестве 0,1% до 2% с периодичностью 1–2 раза в сутки не наблюдалось замедления биологического окисления. Напротив, скорость окисления фенола даже увеличивалась (рис. 10) и достигла 1 г/л.ч при максимальной текущей концентрации фенола 5 г/л. Очевидно, это было обусловлено возрастанием концентрации биомассы фенолдеструкторов в реакционной среде без падения ее удельной активности. Окисление в определенной степени лимитировалось скоростью подачи кислорода в ферментационную среду. Наряду с этим остаточная концентрация фенола в

ферментационной среде все время была на достаточно низком уровне. Увеличение длительности голодания (после исчерпания фенола в среде) в пределах от 12–14 ч до 2–3 сут. приводило лишь к незначительному замедлению скорости окисления фенола при его последующем добавлении. Это означает, что эффективность минерализации органического субстрата в данном случае близка к 100% (без учета небольшой части субстрата, перешедшей в биомассу).

Окисление фенола без появления тенденции к замедлению процесса наблюдалось и после прекращения подачи  $H_2O_2$  (начиная с 1001 ч от начала опыта) и остановилось лишь, когда в среду разово внесли фенол в количестве 6 г/л, оказавшемся критическим для микроорганизмов биоценоза. К этому моменту количество суммарно внесенного фенола составило 100 г/л.

В отличие от неадаптированного, дрожжевой консорциум, адаптированный к  $H_2O_2$ , имел высокую каталазную активность. По мере протекания процесса происходило последовательное изменение окраски среды: бесцветная – светло-коричневая – бурая – черная, что говорит, возможно, о протекании процессов полимеризации промежуточных продуктов, образующихся при окислении фенола. Однако общее содержание твердых веществ в среде, включая клетки микроорганизмов, к концу процесса составило 17 г асв/л.

Полученные показатели биоокисления фенола в 2–3 раза (по скорости окисления) и в 10–20 раз (по количеству суммарно окисленного фенола в среде биологического культивирования) превышают величины, реализуемые в традиционных процессах биологического окисления.

Показанная возможность «бессточного» разложения фенола микроорганизмами, адаптированными к оксидативному стрессу, без накопления продуктов, ингибирующих биологическое разложение, без разбавления токсичного субстрата, без образования сточных вод и большого количества избыточной биомассы создает основу для разработки замкнутых малоотходных высокопроизводительных и низкзатратных систем биологического окисления. При этом достигается высокая окислительная мощность реактора, вносится минимальное количество биогенных элементов, остаточные концентрации субстратов в биологически обработанном стоке минимальны, как и количество накопленного избыточного активного ила. Такие системы интенсивного биологического окисления, ограниченные только массообменными характеристиками биореактора, прежде всего могут найти применение при обезвреживании стоков с высокой концентрацией токсичных органических загрязнений, в частности, фенолов и их производных, других ароматических соединений.

Результаты патентного поиска показали, что процесс биологической очистки с дробным внесением токсичного субстрата и пероксида водорода не имеет мировых аналогов. Он более экологически чистый, более интенсивный при обезвреживании потоков загрязнений с высоким содержанием органических токсикантов, протекает с минимальным образованием вторичных загрязнений и отходов в виде избыточного активного ила, остаточных загрязнений в потоках сточной воды на выходе, остатков компонентов минерального питания микроорганизмов-деструкторов. В этой связи ряд предложенных решений был нами запатентован.

В современных системах на третьей стадии очистки сточных вод (вторичная или третичная очистка) используются биофильтры и SB-реакторы, работающие в отъемно-доливном режиме для удаления соединений азота и фосфора из сточных вод. В SB-реакторах со временем образуется гранулированный ил, что повышает эффективность очистки. В этой связи в диссертационной работе были проведены исследования с оценкой эффективности метода контролируемого оксидативного воздействия на образование **гранул аэробного активного ила (ГААИ)** в отъемно-доливном режиме и **биопленок** применительно к биофильтрам и биотенкам.

В экспериментах, проведенных с модельными хозяйственно-бытовыми стоками и стоками солодовни в отъемно-доливном режиме, очистка активным илом, адаптированным к внесению  $H_2O_2$  на фоне освещения среды видимым светом, происходила намного интенсивнее с увеличением на 20–25% степени очистки по ХПК и эффективным удалением фосфатов по сравнению с контрольными вариантами (рис. 11).

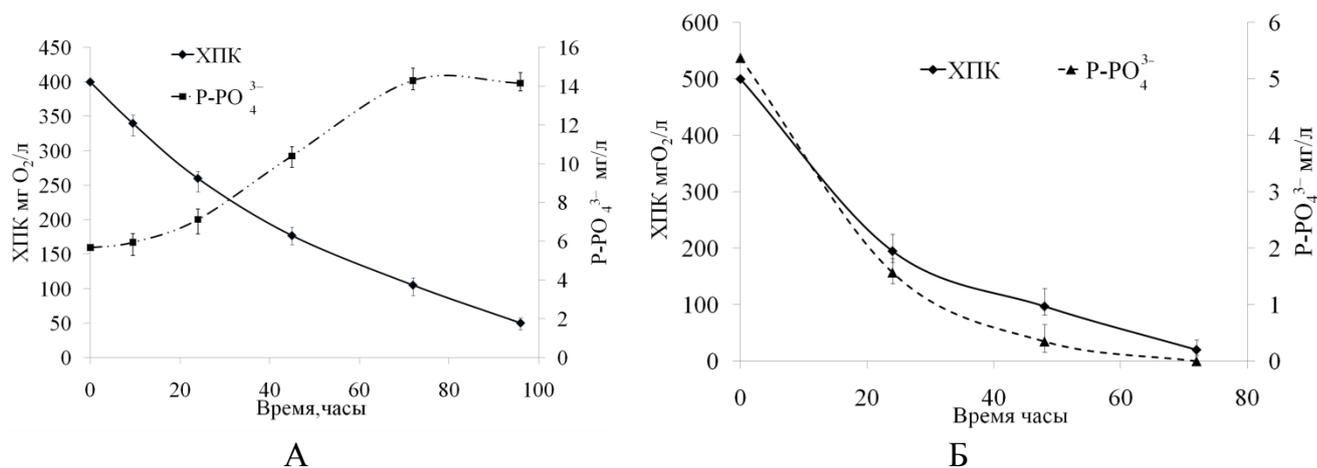


Рисунок 11 – Изменение ХПК и содержание фосфатов при очистке модельного бытового стока. А – контроль с илом без оксидативного воздействия; Б – с контролируемым оксидативным воздействием и илом, адаптированным к перексиду водорода.

Одновременно улучшались гранулообразующая способность ила и стабильность новообразованных гранул. Позитивные эффекты наблюдались и при использовании анолита электрохимического разложения вместо  $H_2O_2$ , независимо от стока и происхождения активного ила.

К концу проведения эксперимента с модельным стоком солодовни (в общей сложности 234 сут.) в СВ-реакторах способность активного ила поглощать фосфор сильно увеличилась и составила в среднем 8,8% внутриклеточного фосфора от сухой массы ила, что характерно для фосфатаккумулирующих микроорганизмов.

Исследование микробиологического профиля микроскопированием, с высевом на селективные среды и методами молекулярно-генетического анализа образцов из различных гранул и их зон, результаты которого подробно описаны в диссертации Хохлачева (2015), выполненной под руководством автора, показало наличие структурообразующих микроорганизмов и точек их иммобилизации с преобладанием бактерий на начальном этапе развития аэробного гранулообразующего микроценоза активного ила. В условиях оксидативного воздействия по мере развития гранул начинают преобладать актиномицеты и грибы с доминированием нескольких видов, идентифицированных молекулярно-генетическими методами как *Agrobacterium tumefaciens*, *Fusarium nivale*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium glabrum* и *Trichosporon cutaneum*. Эти виды формируют основу, к которой прикрепляются другие микроорганизмы. Из них лишь *Penicillium glabrum* во время пересевов сохранял способность образовывать структурные элементы в виде гранул при воздействии  $H_2O_2$ . Изолят *Trichosporon cutaneum* негативно влиял на гранулообразование. Однако все выбранные пять изолятов микроорганизмов оказались неэффективны при очистке сточной воды по отдельности.

Из полученных изолятов можно было сформировать стабильные гранулы ила, при этом порядок заселения микрогранулы и развития сукцессии в такой микроэкосистеме также играли определенное значение, т.е. эволюция последней могла идти по путям различных состояний устойчивости, с различным видовым составом. В пределах диапазона устойчивости эта микроэкосистема относительно стабильна и эволюционирует при сохранении своего видового состава и биоразнообразия, а также выдерживает в 3–4 раза большую концентрацию  $H_2O_2$  по сравнению с отдельными изолятами. Однако качество очистки полученными вариантами гранул было неудовлетворительное, очевидно, из-за того, что в данных гранулах отсутствовали бактериальные культуры, присутствующие в ГАИ, полученному из исходного биоценоза АИ. Таким образом, наличие лишь структурообразующих элементов гранул недостаточно для обеспечения высокого качества очистки. Дальнейшее ведение лучших и наиболее устойчивых вариантов гранул при взаимодействии с исходным илом приводило к заселению их бактериями и повышению качества очистки на фоне

адаптации к пероксиду водорода до уровня очистки модельного стока ГААИ, стабилизированным  $H_2O_2$ . В свою очередь, подсев искусственных гранул к сообществу АИ, отобранного из городских очистных сооружений, приводил к намного более быстрому образованию новых гранул.

Таким образом, совместное воздействие на аэробный АИ факторов оксидативного стресса (пероксида водорода) и низкоинтенсивного видимого света может существенно повысить качество очистки, в частности, в отношении снижения ХПК, удаления фосфатов, устойчивости гранул аэробного АИ, получаемых в условиях отъемно-доливного режима.

В исследованиях, проведенных на базе Института молекулярной генетики РАН (лаборатория регуляции экспрессии генов микроорганизмов, проф. Хмель И.А., аспирант Плюта В.А.) с участием автора диссертационной работы, изучалось воздействие оксидативного стресса, индуцируемого внесением  $H_2O_2$  в среду культивирования, на систему кворум-сенсинг (QS) и образование биопленок бактериями *P. aeruginosa* PAO1, *A. tumefaciens* C58 и *Burkholderia cenocepacia* 370. Бактерии данных видов являются известными модельными микроорганизмами для изучения QS систем и образования биопленок. В диапазоне внесения  $H_2O_2$  в концентрации от 300 до 1500 мкг/мл наблюдалось стимулирование образования биопленок *P. aeruginosa* PAO1 до 2,5 раз (при 1500 мкг/мл) по сравнению с контролем (без  $H_2O_2$ ). Аналогичные закономерности наблюдались при действии  $H_2O_2$  на образование биопленок *B. cenocepacia* 370. В то же время пероксид водорода не действовал подобным образом на образование биопленок *A. tumefaciens* C58. Суспензионные клетки и биопленки *A. tumefaciens* C58 были существенно более чувствительными к действию  $H_2O_2$ , чем клетки *P. aeruginosa* PAO1.

Исследования со штаммом *P. aeruginosa* PAO1/pME6000 с введенным гетерологичным геном АГЛ-лактоназы *aiiA* (ген гомосеринлактоназы из *Bacillus*) и функционирующей QS-системой, использующей ацилгомосерин (АГЛ) в качестве сигнальных молекул, и со штаммом *P. aeruginosa* PAO1/pME6863, в котором было подавлено функционирование Las- и Rhl- QS систем вследствие дегградации АГЛ АГЛ-лактоназой, показали, что эффект стимулирования образования биопленок *P. aeruginosa* PAO1 при действии  $H_2O_2$  зависит от функционирования QS систем, использующих АГЛ в качестве сигнальных молекул.

Таким образом, оксидативный стресс, инициированный действием  $H_2O_2$ , может стимулировать образование биопленок, которое, в свою очередь, связано с функционированием QS-систем регуляции.

В отношении биологической очистки сточных вод стимулирование образования биопленок и в более общем случае размера, морфологии и седиментационных свойств агрегатов активного ила имеет важное практическое значение для устойчивого функционирования очистных сооружений. Такое устойчивое функционирование наблюдалось в экспериментах при очистке модельных стоков пивоварения и хозяйственно-бытовых с оксидативным воздействием в лабораторном **мембранном биореакторе**, основной проблемой которого при эксплуатации является забивка мембран активным илом и резкое снижение их проницаемости. Без оксидативного воздействия активный ил быстро забивал поры мембран, и их проницаемость падала до величины, близкой к нулю. При очистке же с внесением  $H_2O_2$  и освещением очищаемой среды проницаемость мембран оставалась вполне приемлемой, поддерживалась на относительно стабильном уровне, достаточном для рабочего режима мембранного биореактора. Ил образовывал укрупненные хлопья, что, видимо, и обусловило стабильность характеристик мембран. Как видно из результатов, представленных на рис. 12А в отношении показателей очистки ( $XPK_{\text{вых}}$ ), очистка в МБР протекала довольно устойчиво в интервале протока от  $0,001 \text{ ч}^{-1}$  до  $0,1 \text{ ч}^{-1}$  и  $XPK_{\text{вх}}$  от 400 мг  $O_2$ /л до 1200 мг  $O_2$ /л. В установившемся состоянии  $XPK_{\text{вых}}$  менялось в диапазоне от 3 мг  $O_2$ /л до 15 мг  $O_2$ /л, что соответствовало степени очистки от 96% до 98%. Концентрация биомассы постепенно увеличивалась и к концу эксперимента достигла 17 г/л, при которой окислительная мощность составила 115–120 мг/л.ч (рис. 12Б). Дальнейший рост окислительной мощности ограничивался поступлением растворенного кислорода в сточную воду. Проницаемость мембран в течение всего периода функционирования (около 180 сут) поддерживалась на достаточно высоком уровне.

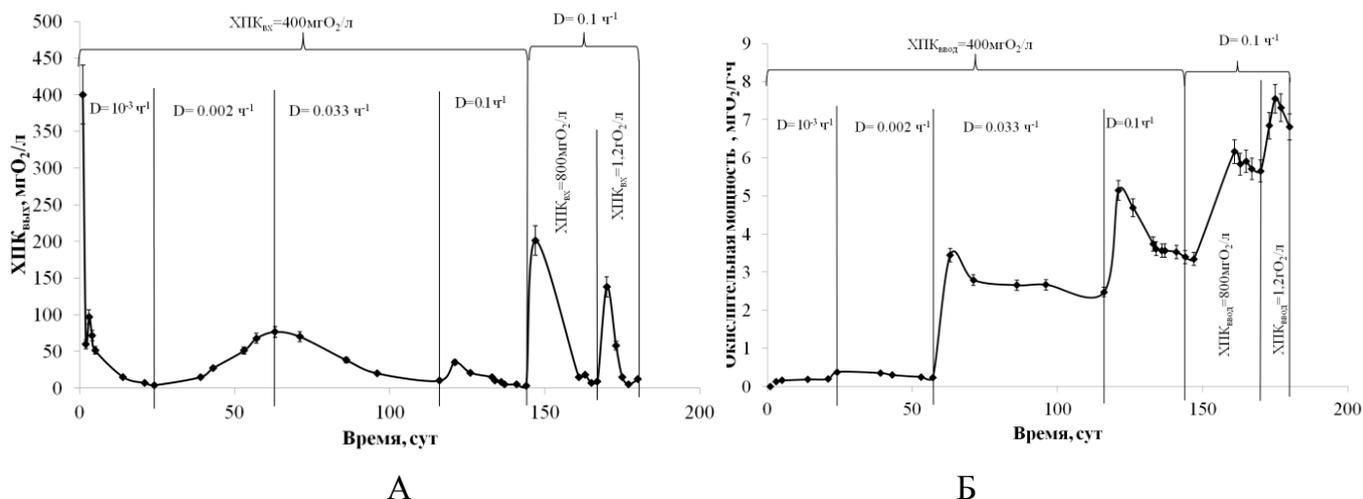


Рисунок 12 – Изменение  $\text{ХПК}_{\text{вых}}$  (А) и окислительной мощности (Б) в ходе эксплуатации МБР с контролируемым оксидативным воздействием.

Мембранный биореактор, работающий в условиях контролируемого оксидативного воздействия с внесением  $\text{H}_2\text{O}_2$ , нами было предложено назвать «Искусственная пероксисома». Систему очистки, одновременно сочетающую мембранные и биологические методы в едином объеме и в условиях комплексного воздействия оптимальных доз стресс- и антистресс-факторов можно уподобить пероксисомам эукариотических клеток.

Для повышения качества биологической очистки сточных вод в условиях оксидативного воздействия важно контролировать **водорослевую и цианобактериальную** составляющие в альгобактериальном активном иле. Условия с освещением среды естественным или искусственным видимым светом могут стимулировать рост фототрофов, что нивелирует позитивный эффект. Проведенные нами эксперименты показали, что кислородные микроводоросли, включенные в хлопья активного ила и биопленку, увеличивают концентрацию органического вещества в очищаемой сточной воде с 30–50 мг/л (по  $\text{ХПК}$ ) до 100–120 мг/л.

Наши исследования с альгобактериальным илом, взятым из лабораторного биореактора, работающего в режиме очистки модельного стока пивоварения, а также с образцами цианобактериальных и альгобактериальных консорциумов, взятых из природных источников, и трех штаммов бактерий-псевдомонад показали, что контролируемое оксидативное воздействие, с одной стороны, может незначительно стимулировать рост микроводорослей после их адаптации к стрессу, с другой стороны – повысить альгицидную активность бактериальной составляющей в альгоцианобактериальных сообществах, которая, в свою очередь, зависит от состава и концентрации видовых компонентов, фазы их роста, длительности адаптации к стрессовому воздействию. При прочих равных условиях преадаптация штамма к  $\text{H}_2\text{O}_2$  резко повышала его альгицидную активность. Так, наиболее активные штаммы, адаптированные к оксидативному стрессу, снижали содержание остаточного хлорофилла *a* в образце из р. Волга в 500 раз, а в образце из оз. Диян Чи (Китай) – в 30 раз. Таким образом, преадаптация штаммов-антагонистов к оксидативному стрессу существенно повышает их альгицидную активность, которая, в свою очередь, скорее всего обусловлена образуемыми ими низкомолекулярными экзометаболитами.

Эксперименты с биологической очисткой модельных стоков в условиях добавления пероксида водорода, освещения очищаемой среды, когда возможно появление и неблагоприятное воздействие на биологическую очистку фототрофов, показали, что в этих условиях основным способом борьбы с избыточным ростом микроводорослей может быть поддержание освещения обрабатываемой среды на уровне, достаточном лишь для протекания фоторепарации у микроорганизмов активного ила, но недостаточном для интенсивного роста микроводорослей. С учетом быстрой скорости генерации бактериальных клеток активного ила, низкой скорости гене-

рации и быстрой скорости деадаптации фототрофов, элиминированию последних может также способствовать дробный режим внесения  $H_2O_2$  с интервалами 2–4 сут. Усиление альгицидной активности бактериальных компонентов при оксидативном воздействии также может способствовать элиминированию фототрофной составляющей из состава активного ила очистного сооружения и повышению качества очистки сточной воды.

Основываясь на полученных экспериментальных данных по биологической очистке сточных вод с использованием совместного воздействия реагентов, действующим началом которых являются АФК, в частности  $H_2O_2$ , и видимого света, названной нами РОВ-технология, в 2020 г. при поддержке фирмы ТДС, Министерства ЖКХ Московской области были проведены испытания предложенной технологии на действующих очистных сооружениях. Полученные в ходе испытаний результаты подтвердили возможность позитивного воздействия контролируемого оксидативного стресса с достижением показателей качества очищенной воды по ХПК  $<10$  мг/л, содержании взвешенных веществ  $<1$  мг/л (табл. 4). По результатам рассмотрения результатов опытно-промышленных испытаний на заседании НТС Министерства ЖКХ Московской области разработанную РОВ-технология рекомендовано использовать при модернизации очистных сооружений и повышения эффективности очистки сточных вод как наилучшей доступной технологии.

Таблица 4 – Сравнение показателей очистки для различных стоков при совместном воздействии РОВ-активатора и видимого света

| Характеристика объекта испытаний  | Режим очистки  | Без РОВ-активатора и освещения         | С РОВ-активатором и освещением   |
|---|--|--|--|
| Коломенский район Моск. обл., поселковые ОС, поток сточной воды 200 м <sup>3</sup> /сут., длительность испытаний 3 мес. | Аэротенк-смеситель с вторичным отстойником   | Усредненное ХПК <sub>вых</sub> 52 мг/л | При дозе РОВ-активатора 4 г/м <sup>3</sup> .сут усредненное ХПК <sub>вых</sub> $<6$ мг/л   |
| г. Клин, городские ОС, поток сточной воды 20000 м <sup>3</sup> /сут., длительность испытаний 2 мес.                     | Аэротенк-вытеснитель с полной нитрификацией, с вторичным отстойником с полным рециклом возвратного ила | Взвешенные в-ва на выходе 10-30 мг/л   | При дозе РОВ-активатора 2 г/м <sup>3</sup> .сут возможно снижение содержания взвешенных веществ на выходе до величин менее 1 мг/л, очистка с полным возвратом ила в течение 1,5 мес. |

В испытаниях на поселковых ОС (Коломенский район) после адаптации ила к оксидативному воздействию реагента внесение активатора в дозах 4 г/м<sup>3</sup>.сут (в пересчете на активное вещество), наблюдалось снижение показателя ХПК в выходной воде до недетектируемых величин (менее 10 мг/л). Эффект снижения ХПК до минимально возможных значений был стабилен и наблюдался на протяжении более чем 30 суток, когда активатор (на основе пероксида водорода) вносился в оптимальных дозах. Одновременно наблюдалось повышение скорости и степени нитрификации и снижение содержания фосфатов в выходящей воде, а также возрастание удельной активности ила по удалению соединений азота и фосфатов из сточной воды. При прекращении внесения активатора показатели биологической очистки возвращались к величинам, наблюдавшимся до его внесения.

Таким образом, применительно к поселковым сооружениям биологической очистки проведенные испытания технологии очистки хозяйственно-бытовых сточных вод с регулируемым оксидативным воздействием (РОВ-технологии) показали высокую эффективность в отношении удаления органических загрязнений с возможностью достижения степени очистки в одностадийном процессе по показателю ХПК 99,2%, что обеспечивает абсолютные значения ХПК в очищенной воде ниже ПДК для рыбохозяйственных водоемов с одновременным повышением степени удаления биогенных элементов из сточных вод.

Оценочные расчеты показывают, что суммарные эксплуатационные затраты на реагент и освещение при очистке сточных вод с оптимальным оксидативным воздействием составят 0,8–1,1 руб./м<sup>3</sup> очищаемой воды или 0,4–0,6 руб./кг удаленного ХПК при минимальных капитальных затратах. Такие затраты составляют 20–30% от затрат на электроэнергию при использовании наиболее экономичных аэраторов, однако при этом качество очистки сточных вод по показателю ХПК повысится от 1,5 до 3 раз без ухудшения других показателей очистки, без падения скорости биологического окисления и окислительной мощности сооружений или обеспечат одно и то же качество очистки при повышении нагрузки и окислительной мощности сооружений биологической очистки в 1,5–2 раза, снижении площадей, занимаемых новыми вводимыми в эксплуатацию очистными сооружениями, а также снижении совокупных эксплуатационных и капитальных затрат на 10–15% при одном и том же качестве очистки.

Показанное в работе улучшение показателей биосинтеза и биологической очистки, наблюдаемое при оптимальных условиях воздействия АФК, мы объясняем изменением метаболизма популяции под действием относительно малых доз H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, регуляторной, физиологической ролью комбинированного воздействия H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и видимого света. В пользу этих предположений свидетельствует универсальность обнаруженных эффектов, показанная на примере различных модельных систем, и литературные данные.

Основываясь на существующих данных, можно утверждать, что обнаруженная возможность определенного положительного совместного воздействия стрессорных и антистрессорных факторов на микроорганизмы, на показатели биосинтеза обусловлена протеканием двух разнонаправленных процессов метаболического ответа: 1) изменением внутриклеточного метаболизма под действием факторов оксидативного стресса и 2) индукцией фоточувствительных систем ответа на оксидативный стресс, вероятно, системы фоторепарации и кросс-реакций, метаболически связанных с фоторепарацией других систем ответа на стресс. Также в ответ на оксидативный стресс могут быть вовлечены внутриклеточные системы и процессы, связанные с голоданием, сменой субстратов, тепловым шоком, осмотическим воздействием, репарацией ДНК, с кворум-сенсингом, переходом в активное или покоящееся состояние, с катаболитной дерепрессией, одновременно активируемыми при стрессовых воздействиях и функционирующими в тесной связи друг с другом. О наличии перекрестных кросс-реакций свидетельствуют и данные о схожей реакции микроорганизмов на действие мягкого УФА излучения и видимого света, пероксида водорода и видимого света, анолита электрохимического разложения и видимого света.

Популяционные изменения, видимо, имеют место, поскольку путем адаптации микробных клеток к постепенно повышающимся дозам окислительных стресс-факторов можно добиться повышения их устойчивости. На уровне фенотипа устойчивость обеспечивается «запуском» спустя несколько часов систем ответа на оксидативный стресс. Изменения на уровне генотипа могут заключаться в отборе клонов с повышенным количеством ферментов и протекторов, участвующих в защите клеток. Наряду с этим, в замкнутых непрерывных системах культивирования с частичным или полным рециклом биомассы, когда высокие скорости роста не имеют большого значения, возможен дрейф физиологических свойств популяций в сторону более полного и экономичного использования субстрата. Также автоселекция в этих условиях должна быть более благоприятна для клеток, устойчивых к голоданию и к другим стрессам. Такая устойчивость повышается в условиях образования микробными клетками агрегатов, флокул, биопленок, гранул. В последнем случае отбор также идет в сторону более полного использования субстрата, а для биологической очистки сточных вод – повышения эффективности очистки.

При использовании продуцентов-сверхсинтетиков, полученных традиционными методами селекции или методами геной и метаболической инженерии, любой процесс, ведущий к нестабильности генома, будет способствовать быстрой утрате микробной популяцией внедренных изменений. В аэробных условиях этому может способствовать воздействие АФК, всегда образующихся в качестве побочных продуктов аэробного дыхания и провоцирующих образование мутантных или модифицированных форм. Таким образом, для рекомбинантных продуцентов един-

ственная стратегия сохранения их биосинтетической активности в условиях культивирования в биореакторе – использование методов, повышающих стабильность измененного генома. При аэробном культивировании методами стабилизации, в частности, могут быть фоторепарация, внесение антиоксидантов в ферментационную среду или нейтрализация веществ – компонентов питательной среды с оксидантной или прооксидантной активностями.

Для аэробных и факультативных микроорганизмов, использованных в нашей работе, результат сочетанного воздействия стресс- и антистресс-факторов проявляется в приобретении способности более полно окислять вещества с уменьшением количеств остаточных концентраций субстратов и/или побочных метаболитов, накапливаемых в среде культивирования и ингибирующих рост популяции. Доли жизнеспособных и физиологически активных клеток, преадаптированных к  $H_2O_2$  на фоне освещения среды культивирования, способность к их совместной адгезии и агрегации повышаются, клетки сохраняют свою измененную физиологию в течение достаточно длительного времени. Их активность мало меняется после длительного субстратного голодания и сохраняется в течение достаточно длительного времени без внесения  $H_2O_2$ .

Наконец, еще одно обстоятельство, которое надо учитывать, – возможность одновременно прооксидантного и антиоксидантного действия факторов окружения: видимого света и химических веществ, в том числе компонентов питательных сред и продуктов метаболизма, находящихся в среде.

Прооксидантное действие, проявляющееся как эффект старения среды, наблюдалось нами в опытах с галобактериями и с продуцентом рибофлавина. Оно может быть устранено обработкой ферментационной среды адсорбентами, как у галобактерий, или добавлением химических антиоксидантов. Свет в этом случае также может выступать как фактор с прооксидантными и антиоксидантными свойствами. Прооксидантное действие света может проявляться в виде увеличения количества окисленных продуктов фотохимической трансформации веществ, в частности, каротиноидов. Антиоксидантное действие света может проявляться через механизм стимулирования синтеза каротиноидов и фоторепарацию. Все это свидетельствует о важности оптимальных воздействий факторов оксидативного стресса (перекисей, радикалов, УФ-излучения) на популяции микроорганизмов.

## **Выводы**

1. Впервые системно изучено и показано, что совмещение по месту и времени абиотических и биотических процессов трансформации веществ в единой экологической нише, стрессорных и антистрессорных факторов с использованием направленных адаптационных изменений в популяциях микроорганизмов позволяет существенно расширить возможности управляемого культивирования микроорганизмов и улучшить технологические, экологические и экономические показатели биосинтеза и биодеструкции органических веществ.

2. Основываясь на существующих литературных и собственных экспериментальных данных выдвинуто предположение, что обнаруженная возможность определенного положительного совместного воздействия стрессорных и антистрессорных факторов на микроорганизмы, на показатели биосинтеза обусловлена: 1) адаптивной эволюцией и внутривидовыми изменениями; 2) изменением внутриклеточного метаболизма под действием факторов оксидативного стресса; 3) регуляторными функциями низких концентраций пероксида водорода и других АФК; 4) индукцией фоточувствительных систем ответа на оксидативный стресс, вероятно, системы фоторепарации и кросс-реакций метаболически связанных с фоторепарацией других систем ответа на стресс.

3. Научно обоснованы пути совершенствования микробиологических систем культивирования и биологической очистки с использованием совмещенных процессов и гибридных биореакторов: высокоплотного культивирования, мембранного биореактора, адсорбционной культуры, воздействия пероксида водорода и видимого света, мягкого ультрафиолета и видимого света, средств, которые подавляют абиотические реакции, протекающие в ходе ферментации, и тем самым устраняют неблагоприятное воздействие продуктов фотохимических и химических реак-

ций на клетки микроорганизмов или, напротив, индуцируют у микроорганизмов системы ответа на оксидативный стресс.

4. Экспериментально установлены диапазоны доз стрессоров ( $H_2O_2$  и других АФК) и антистрессоров, другие условия для достижения наибольшего положительного эффекта, при которых наблюдаемые физиологические изменения в популяциях микроорганизмов улучшают технико-экономические и экологические показатели процессов биосинтеза и биодеструкции.

5. Положительный эффект совместного действия стресс- и антистресс-факторов в отношении биологической очистки сточных вод проявляется при использовании различных активных форм кислорода ( $H_2O_2$ , анолит электрохимического разложения раствора  $NaHCO_3$  и др.), при различных способах очистки, нагрузках, содержании загрязнений (ХПК, биогенных элементов) в исходной воде, температурах, режимах внесения  $H_2O_2$ , с флокулами и гранулами активного ила, биопленками.

6. В условиях совмещенных процессов и селективного оптимального оксидативного стрессового воздействия в ходе ферментации возможно:

- получение биомассы кормовых дрожжей в режиме высокоплотностного культивирования с подпиткой субстратом с содержанием биомассы до 160 г/л (по асд) с повышением продуктивности биореактора по биомассе дрожжей с 2,5–3 г асд/л.ч – в периодическом без подпитки субстратом или в непрерывном хеMOSTАТНОМ режиме и до 4–7 г асд/л.ч – в высокоплотностном режиме с подпиткой субстратом, повышением выхода биомассы от субстрата на 5–15%, содержания белка в биомассе на 7–10%, устойчивости к высоким концентрациям субстратов и другим стресс-факторам без появления признаков ингибирования роста и физиологической активности продуктами метаболизма с одновременным снижением содержания остаточных концентраций субстратов и внеклеточных продуктов метаболизма, обеспечением 30–50%-ой экономии питательных солей, снижением количества сточных вод и концентрации остаточных загрязнений в них в 5–10 раз, без необходимости в энергоемких стадиях сгущения биомассы, что позволяет снизить суммарные затраты на сырье и энергию на 15–20%;

- повышение жизнеспособности клеток дрожжей-сахаромицетов в процессе спиртового брожения до 95–99% и их бродильной активности на 10–40%, выхода этанола на 2–5%, при одновременном сокращении времени брожения в периодических условиях на 30%, повышении устойчивости дрожжей к закислению среды, более длительном сохранении физиологической активности клеток и продуктивности биореактора, снижении общей обсемененности и содержания остаточных субстратов и примесей в сброженном сусле в 1,5–3 раза и совокупных эксплуатационных затрат на 5–20%;

- повышение производительности биореакторов до 10 раз с достижением продуктивности до 50 г/л.ч при культивировании молочнокислых бактерий – продуцентов молочной кислоты в мембранном биореакторе в отъемно-доливном режиме при содержании молочной кислоты 100 г/л, степени конверсии глюкозы в молочную кислоту 95–97%, с одновременным повышением выхода молочной кислоты из углеводного субстрата на 2–5%, снижением расхода дорогостоящих ростовых факторов в 2–3 раза, снижением содержания примесей в фильтрате культуральной жидкости и в получаемом полупродукте на стадии выделения молочной кислоты, безостановочным ведением процесса в течение несколько недель и более без отвода накапливаемой избыточной биомассы, упрощением поддержания асептических условий и доминированием культуры в мембранном биореакторе, снижением количества образуемой избыточной биомассы до величин не более 4,5 г/кг молочной кислоты, что ниже в 10 раз по сравнению с традиционным методом периодического культивирования при полном отсутствии гипса как отхода, и, как следствие, улучшением экономических и экологических показателей процесса и достижением конкурентоспособной цены – не выше 900–1200 EUR за тонну МК;

- повышение производительности биореакторов до 20 раз при культивировании галобактерий и биосинтезе бактериородопсина по варианту адсорбционной культуры с подпиткой субстратом с минимальным содержанием каротиноидов, что позволяет за один цикл повысить: уро-

вень накопления биомассы в среде культивирования с 4–4,5 г/л (по асб) с суммарным содержанием БР 70–75 мг/л за 6–7 сут. для обычной периодической ферментации до 30–50 г/л биомассы и 1700–1750 мг/л БР за 8 сут. ферментации, с удельным содержанием БР в биомассе 2–4%, что значительно упрощает технологию выделения бактериородопсина, а также в несколько раз снижает объем высокоминерализованных жидких стоков, затраты на выделение БР в составе пурпурных мембран и его стоимость от нескольких десятков до нескольких сотен раз (до 1 руб./мг БР) при обеспечении высокого качества получаемых образцов пурпурных мембран;

- повышение устойчивости биосинтетической активности рекомбинантных штаммов за счет снижения скорости реверсии к прототрофным вариантам из-за прооксидантного действия компонентов среды культивирования, в частности, рибофлавина.

7. Проведение биологической очистки в условиях селективного и оптимального оксидативного стрессового воздействия активными формами кислорода позволяет:

- перерабатывать высококонцентрированные токсичные стоки, в частности фенолсодержащие, в режиме интенсивного культивирования с подпиткой субстратом (суммарно до 100 г/л и более по фенолу), лимитируемого только массообменными возможностями биореакторов, с полной минерализацией органического вещества без накопления продуктов, ингибирующих биологическое разложение, с минимальным образованием избыточного активного ила, вторичных сточных вод и остаточных загрязнений;

- при типичной нагрузке по ХПК<sub>вых.</sub> 500–2000 мг/л.сут. снижать ХПК<sub>вых.</sub> в процессах одностадийной аэробной биологической очистки сточных вод в аэротенках проточного типа с вторичным отстойником до величин, близких к нулю, с одновременным повышением степени удаления соединений азота и фосфора;

- повышать скорость образования и стабильность биопленок и гранул активного ила в аэробных условиях и SB-реакторах, эффективность удаления органических загрязнений и биогенных элементов в SB-реакторах;

- поддерживать агрегатное состояние и морфологию активного ила, снижающих кольматацию мембран в системах биологической очистки на основе мембранных биореакторов (система «искусственная пероксисома»), что важно для стабильности работы МБР;

- реализовать процесс с оптимальным оксидативным стрессовым воздействием с улучшением показателей аэробной биологической очистки по ХПК<sub>вых.</sub> в 1,5–3 раза на действующих сооружениях с активным илом, биопленкой, гранулами ила без их существенной модернизации, при этом в наиболее экономичном варианте при фактическом отсутствии капитальных затрат дополнительные суммарные эксплуатационные затраты на очистку сточных вод составят не более 20–30% от затрат на аэрацию. При одном и том же качестве очистки – повысить нагрузку и окислительную мощность сооружений в 1,1–2 раза, снизить площади, занимаемые новыми вводимыми в эксплуатацию очистными сооружениями, а также совокупные эксплуатационные и капитальные затраты на 10–15%. Разработанная технология с регулируемым оксидативным стрессовым воздействием может быть отнесена к наилучшей доступной из существующих на сегодня технологий одностадийной аэробной биологической очистки.

8. На основе полученных результатов:

- разработан разовый технологический регламент и базовая схема технологического процесса на получение L-молочной кислоты в виде лактата аммония в составе постферментационной среды (бесклеточной культуральной жидкости, КЖ) методом микробиологического синтеза из различных видов глюкозосодержащего сырья для последующего производства L-молочной кислоты полимерного качества на опытной установке, мощностью не менее 1300 тонн в год по потребляемой глюкозе. Получаемая бесклеточная КЖ предназначена для последующего выделения молочной кислоты (в виде бутиллактата), получения лактида и полилактида в количестве 500 т/год по полилактиду;

- проведены опытно-промышленные испытания на сооружениях биологической очистки хозяйственно-бытовых стоков, подтвердившие эффективность технологии с оптимальным окси-

дательным стрессовым воздействием с достижением ХПК и содержания взвешенных веществ на выходе из очистных сооружений, близких к нулю, а также поддержанием высокой эффективности нитрификации в режиме с полным возвратом ила.

**Результаты диссертационной работы изложены в 110 публикациях, основными из которых являются следующие:**

**Статьи в журналах, входящих в реферативные базы ISI Web of Science и Scopus:**

1. Kouznetsov A., Safronov V. High intensive closed microbiological system of phenol destruction. //In: Recents Progres en Genie des Procedes. – Proceedings of the 8th Congress of Francophone Countries "8ème Congrès Francophone de Génie des Procédés", Nancy. 17-19 October 2001. – V. 15 – 2001, N 86. – P.115-122.

2. Kouznetsov A., Kniyazev O. Microbial treatment of ion exchange resins. //In: Recents Progres en Genie des Procedes. – Proceedings of the 8th Congress of Francophone Countries "8ème Congrès Francophone de Génie des Procédés", Nancy. 17-19 October 2001. – V. 15 – 2001, N 86. – P. 427-434.

3. Kouznetsov A.Ye., Kalyonov S.V. Simultaneous hybrid processes as a way to improve characteristics of cultivation of micro-organisms and biodestruction of pollutants. //European Symposium on Environmental Biotechnology (ESEB 2004), Oostende (Belgium), April 25-28. – 2004. – P. 727-730.

4. Kouznetsov A.Y., Kalyonov S.V., Soldatov V.I., Seregin A.M., Strakhovskaya M.G., Skladnev D.A. Light as an ambient control factor in the systems of microbiological cultivation and biodestruction. //European Symposium on Environmental Biotechnology (ESEB 2004), Oostende (Belgium), April 25-28. – 2004. – P. 515-518.

5. Kouznetsov A.Ye., Stepanenkov V.A. An Anammox-like process in the waste water treatment of the coke-chemical plant. //European Symposium on Environmental Biotechnology (ESEB 2004), Oostende (Belgium), April 25-28. – 2004. – P. 653-656.

6. Плюта В.А., Липасова В.А., Кузнецов А.Е., Хмель И.А. Действие салициловой, индолил-3-уксусной, гиббереллиновой и абсцизовой кислот на образование биопленок бактериями *Agrobacterium tumefaciens* C58 и *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. // Биотехнология – 2012, № 3. – С. 53-58.

7. Plyuta V., Zaitseva J., Lobakova E., Zagoskina N., Kuznetsov A., Khmel I. Effect of plant phenolic compounds on biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*. // APMIS. – 2013. – 121 (11). – P. 1073-1081.

8. Pliuta V.A., Andreenko Iu.V., Kuznetsov A.E., Khmel I.A. Formation of the *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilms in the presence of hydrogen peroxide; the effect of the *AiiA* gene // Mol. Gen. Microbiol. Virusol. – 2013. – 4. – P. 10-14.

9. Khokhlachev N.S., Kalenov S.V., Zanina O.S., Tyupa D.V., Baurina M.M., Kuznetsov A.Ye. The role of stress agents as operating factors in formation and functioning of granular aerobic activated sludge at model domestic wastewater treatment. // Bioprocess Biosyst. Eng. – 2014, 37(9). – P. 1771-1779.

10. Плюта В.А., Попова А.А., Кокшарова О.А., Кузнецов А.Е., Хмель И.А. Способность природных кетонов взаимодействовать с бактериальными Quorum Sensing системами // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология – 2014. – № 4. – С. 10-13.

11. Plyuta V.A., Lipasova V.A., Koksharova O.A., Veselova M.A., Kuznetsov A.E., Khmel I.A. The effect of introduction of the heterologous gene encoding the N-acyl-homoserine lactonase (*aiiA*) on the properties of *Burkholderia cenocepacia* // Russian Journal of Genetics – 2015. – V. 51. – No 8 – P. 737-744.

12. Tyupa D.V., Kalenov S.V., Skladnev D.A., Khokhlachev N.S., Baurina M.M., Kuznetsov A.Y. Toxic influence of silver and uranium salts on activated sludge of wastewater treatment plants and synthetic activated sludge associates modeled on its pure cultures // Bioprocess Biosyst. Eng. – 2015. – V. 38. – No 1. – P. 125-135.

13. Tyupa D.V., Kalenov S.V., Baurina M.M., Kabanov O.V., Skladnev D.A., Kuznetsov A.Ye. Optimization of silver biosorption by fungi forming granules from aqueous solutions of silver nitrate // Clean Techn. Environ. Policy – 2016. Article online, DOI 10.1007/s10098-016-1187-y.

14. Tyupa D.V., Kalenov S.V., Baurina M.M., Panfilov V.I., Kuznetsov A.Ye., Skladnev D.A. A facile method for formation of synthetic activated sludge granules with enhanced tolerance to metal ion toxicity // *J. Chem. Technol. Biotechnol.* – 2016. – V. 91. – N 2. – P. 532-538.
15. Kalenov S.V., Baurina M.M., Skladnev D.A., Kuznetsov A.Y. High-effective cultivation of *Halobacterium salinarum* providing with bacteriorhodopsin production under controlled stress // *J. of Biotechnology* – 2016. Article online, DOI 10.1016/j.jbiotec.2016.07.014
16. Kozlovskiy R., Shvets V., Kuznetsov A. Technological aspects of the production of biodegradable polymers and other chemicals from renewable sources using lactic acid / *Journal of Cleaner Technology* – 2017. – V. 155. – P. 157-153, DOI 10.1016/j.jclepro.2016.08.092
17. Kuznetsov A., Beloded A., Derunets A., Grosheva V., Vakar L., Kozlovskiy R., Shvets V. Biosynthesis of lactic acid in a membrane bioreactor for cleaner technology of polylactide production // *Clean Techn. Environ. Policy* – 2017. – V. 19. – N 3. – P. 869–882, DOI 10.1007/s10098-016-1275-z
18. Konoplev I.A., Kozlovskii R.A., Shvets V.F., Kuznetsov A.E., Beloded A.V., Kagramanov G.G., Safronov V.A., Yartym A.I. Preparation of L-lactide of polymerization purity with removal of impurities by fractional melting. // *Russian Journal of Applied Chemistry* – 2017. – V. 90. – N 3. – P. 415-422, DOI: 10.1134/S1070427217030144
19. Konoplev I., Kozlovskiy R., Shvets V., Beloded A., Kuznetsov A., Kagramanov G., Safronov V., Yartym A. Purification of crude lactide to polymerization grade purity by melt recrystallization method. // *Asian Journal of Chemistry*. – 2017. – V. 29. – N 8. – P. 1797-1802. DOI: 10.14233/ajchem.2017.20639

#### **Статьи в журналах из перечня ВАК РФ:**

20. Манаков М.Н. Кузнецов А.Е., Марквичев Н.С., Свитцов А.А. Мембранные реакторы в биотехнологии // *Биотехнология*. – 1988. – Т. 4. – № 2. – С. 162-175.
21. Подобрый О.С., Кузнецов А.Е., Манаков М.Н. Влияние фракции культуральной жидкости 5-50 кД на рост дрожжей *Candida utilis* // *Биотехнология*. – 1991. – Т.7. – №6. – С. 40-43.
22. Подобрый О.С., Кузнецов А.Е., Лахтин В.М., Цыряпкин В.А., Ямсков И.А., Манаков М.Н. Изучение высокомолекулярных аутоиндукторов биосинтеза у дрожжей *Candida utilis* и бактерий *Corynebacterium*. // *Биотехнология*. – 1993. – Т.9 – № 4. – С. 10-13.
23. Подобрый О.С., Белов А.П., Кузнецов А.Е., Смолина Г.А. Изучение закономерностей выделения и механизмов воздействия аутоиндукторов из дрожжей *Candida utilis*. // *Микробиология*. – 1993. – Т.62. – № 4. – С. 1056-1063.
24. Кузнецов А.Е., Князев О.В., Мареев И.Ю., Манаков М.Н. Биотехнологическая деструкция ионообменных смол. // *Биотехнология*. – 2000. – Т. 16. – № 1. – С. 66-77.
25. Князев О.В., Кузнецов А.Е. Изучение условий микробной деструкции катионита КУ-2-8. // *Биотехнология*. – 2000. – Т.16. – № 1. – С. 78-84.
26. Синицын А.В., Кузнецов А.Е., Чеботаева М.В. Анаэробно-аэробная технология очистки сточных вод пивоваренных предприятий России // *Экология и промышленность России*. – 2005. – № 12. – С. 20-25.
27. Каленов С.В., Кузнецов А.Е. Ресурсосберегающая технология получения бактериородопсина на основе галобактерий. // *Химическая промышленность сегодня*. – 2007. – №3. – С. 23-32.
28. Кузнецов А.Е., Колотилин Д.В., Хохлачев Н.С., Калёнов С.В., Занина О.С. Аэробная биологическая очистка сточных вод в условиях гранулообразования активного ила. I. Гранулообразование активного ила при очистке модельных стоков. // *Вода: химия и экология*. – 2013. – № 7. – С. 35-44.
29. Хохлачев Н.С., Калёнов С.В., Занина О.С., Кузнецов А.Е. Аэробная биологическая очистка сточных вод в условиях гранулообразования активного ила. II. Гранулообразование активного ила в условиях контролируемого оксидативного стресса. // *Вода: химия и экология*. – 2013. – № 8. – С. 31–42.

30. Габленко М.В., Кручинина Н.Е., Кузнецов А.Е., Иванцова Н.А. Биологическая очистка сточных вод пивоваренного производства в присутствии электрохимически синтезированного оксиданта. // Вода: химия и экология. – 2012. – № 2. – С. 33-37.

31. Миняева Д.А., Фу Йиганг, Вакар Л.Л., Кузнецов А.Е. Альгицидное воздействие бактериальных штаммов, выделенных из альгоцианобактериального консорциума оз. Диян Чи. // Вода: химия и экология. – 2013. – № 5. – С. 60–66.

32. Миняева Д.А., Йиганг Фу, Калёнов С.В., Вакар Л.Л., Кузнецов А.Е. Адаптация к оксидативному стрессу как способ повышения активности бактериальных антагонистов автотрофных микроорганизмов, ухудшающих очистку сточных вод. // Вода: химия и экология. – 2014. – № 7(73). – С. 29 – 35.

33. Дерунец А.С., Шевченко И.А., Хабибулина Н. В., Белодед А.В., Кузнецов А.Е. Оптимизация состава питательной среды для микробиологического синтеза молочной кислоты бактериями *Lactobacillus paracasei* // Бутлеровские сообщения. – 2017. – Т.50. – №5. – С. 19-27. ROI: jbc-01/17-50-5-19

34. Кузнецов А.Е. Совершенствование микробиологических процессов культивирования на основе принципов экологически чистого производства. // Актуальная биотехнология. – 2018. – № 3(26). – С. 224-230.

#### **Патенты и авторские свидетельства**

35. Патент РФ № 2188164 (от 27.08.02). Способ биологической очистки сточных вод от фенола (Сафронов В.В., Кузнецов А.Е.). Приоритет от 03.11.2000 г.

36. Патент РФ № 2209186 (от 26.12.2003). Способ биологической очистки сточных вод от органических соединений (Кузнецов А.Е., Сафронов В.В.). Приоритет от 26.12.2000 г.

37. Патент РФ № 2268924 (от 23.11.04). Способ получения биомассы дрожжей (Кузнецов А.Е., Сорокодумов С.Н., Крылов И.А.).

38. Патент РФ № 2323226 Способ получения биомассы галобактерий (Кузнецов А.Е., Калёнов С.В.). Приоритет от 30.05.2006.

39. Патент РФ № 2323251 Способ получения биомассы галобактерий (Кузнецов А.Е., Калёнов С.В.). Приоритет от 30.05.2006.

40. Патент РФ № 2394098 (от 10.06.2009). Способ культивирования дрожжей для получения этанола (Калёнов С.В., Кузнецов А.Е.). Приоритет от 28.11.2007.

41. Патент РФ № 2586155 Способ биологической очистки сточных вод и устройство для его осуществления. (Листов Е.Л., Пыстина Н.Б., Хохлачев Н.С., Никишова А.С., Попов П.Б., Калёнов С.В., Кузнецов А.Е.). Приоритет 05 марта 2015 г. по заявке № 2015107707/05(012452).

42. Патент РФ № 2712703 (от 30.01.2020). Способ культивирования молочнокислых бактерий для получения молочной кислоты (Дерунец А.С., Кузнецов А.Е.) опубл. 30.01.2020.

#### **Учебные пособия**

43. Кузнецов А.Е., Градова Н.Б. Научные основы экобиотехнологии. – М. Мир, 2006. – 504 с.

44. Кузнецов А.Е., Градова Н.Б., Лушников С.В. и др. Прикладная экобиотехнология. – Учебное пособие: в 2 тт. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2010. – Т. 1 – 629 с., Т 2 – 485 с. Переиздание 2012, 2015 гг.

45. Красноштанова А.А., Кузнецов А.Е., Баурина М.М., Калёнов С.В., Панфилов В.И. Проектирование биотехнологических производств: учеб. пособие – М. : РХТУ имени Д. И. Менделеева, 2018. – 228 с.

*Выражаю глубокую благодарность всем коллегам, оказавшим содействие выполнению настоящей работы.*