

УДК 579.6:579.85

Т. Є. Виграєнко, І. Є. Соколова

Дніпропетровський національний університет ім. Олесь Гончара

ДЕСТРУКЦІЯ ОРГАНІЧНИХ РЕЧОВИН І ПРОДУКЦІЯ БІОГАЗУ МІКРООРГАНІЗМАМИ, ВИДІЛЕНИМИ ІЗ ПРИРОДНИХ СУБСТРАТІВ

Виділено газотвірні мікроорганізми з природних середовищ – ґрунтової витяжки та компосту. Вивчено властивості отриманих культур мікроорганізмів як деструкторів органічних речовин. Досліджені бактерії культивували на експериментальних напівсинтетичних середовищах із деревною тирсою та карбоксиметилцелюлозою. У процесі культивування вивчали ріст при різних значеннях *pH*, динаміку росту, кількість утилізованих цукрів, об'єм виділеного газу. Найінтенсивніший ріст газотвірних культур спостерігається на середовищі з КМЦ, а здатність до газоутворення найбільше виражена у культури бактерій, виділених із компосту.

Т. Е. Выграенко, И. Е. Соколова

Днепропетровский национальный университет им. Олесь Гончара

ДЕСТРУКЦИЯ ОРГАНИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ И ПРОДУКЦИЯ БИОГАЗА МИКРООРГАНИЗМАМИ, ВЫДЕЛЕННЫМИ ИЗ ПРИРОДНЫХ СУБСТРАТОВ

Выделены газообразующие микроорганизмы из природных сред: почвенной болтушки и компоста. Изучены свойства полученных культур микроорганизмов как деструкторов органических веществ. Исследуемые бактерии культивировали на экспериментальных полусинтетических средах с древесными опилками и карбоксиметилцеллюлозой. В процессе культивирования изучали рост при различных значениях *pH*, динамику роста, количество утилизируемых сахаров, объем выделенного газа. Наиболее интенсивный рост газообразующих культур наблюдается на среде с КМЦ, а способность к газообразованию наиболее выражена у культуры бактерий, выделенных из компоста.

T. E. Vygrayenko, I. E. Sokolova

Oles' Gonchar Dnipropetrovsk National University

DESTRUCTION OF ORGANIC MATTER AND BIOGAS PRODUCTION OF MICROORGANISMS ISOLATED FROM NATUREL SUBSTRATES

Gas-producing bacteria were isolated from natural media: soil and compost extracts. The properties of the obtained microorganisms cultures as destructors of organic substances were studied. Studied bacteria were cultivated in experimental semi-synthetic media with saw dust and carboxymethyl cellulose. A growth at different *pH* values, a dynamics of growth, an amount of utilized sugar, a volume of released gas during cultivation were studied. Most intensive growth of gas-producing cultures has been observed in a medium with CMC and the ability to gas producing was more manifested in the bacterial culture isolated from the compost.

Вступ

Інтенсифікація сільського господарства, технічний прогрес у промисловості, на транспорті призвели до утворення диспропорції в навколишньому середовищі, до деформації встановленої рівноваги екосистем, погіршення екологічної ситуації в усіх

сферах діяльності людини [7]. Також погіршується ситуація відносно традиційних джерел енергії: ускладнюються умови та зростає ціна на їх видобування [4; 5]. Вичерпання природних енергоносіїв і пошук нових альтернативних джерел палива – одне з найважливіших питань, які постали перед людством.

У зв'язку з ускладненою екологічною ситуацією актуальним залишається питання пошуку альтернативних джерел палива та енергії, де використовуються не тільки вітер, вода та сонячне світло, а й різні відходи, що є економічно вигідним та дозволяє позбутися речовин, які забруднюють навколишнє середовище [10; 14]. Особливу увагу привертають газотвірні мікроорганізми [1], здатні не тільки виділяти в процесі життєдіяльності метан, який становить складову частину біогазу, а й брати участь у деструкції органічних речовин [9; 11; 13].

Мета даної роботи – виділити газотвірні культури мікроорганізмів із ґрунтової витяжки та компосту, оцінити їх здатність рости на модельних напівсинтетичних середовищах і спричиняти деструкцію органічних речовин із виділенням газу.

Матеріал і методи досліджень

Із метою отримання газотвірних мікроорганізмів використовували метод виділення мікробів із природних середовищ – ґрунтової витяжки та компосту [8]. Для цього у щільно набитий у колбу компост і ґрунтову витяжку додавали крейду для стабілізації *pH* і проводили культивування в анаеробних умовах протягом 7 діб. У результаті в обох природних середовищах утворювались асоціації мікробів, здатних утилізувати названі субстрати. Далі відфільтровану рідину з середовищ в об'ємі 5 мл вносили в колби з 300 мл бідного синтетичного середовища такого складу: $CaCO_3$ – 6,50 г/л, $(NH_4)_2SO_4$ – 4,16, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,51, K_2HPO_4 – 1,00, $NaCl$ – 2,00 г/л, $FeSO_4$ – 1 мл 0,76 % розчину на 100 мл середовища. Мікробні культури вирощували в синтетичних середовищах в умовах глибинного культивування на качалці при +37 °С протягом 10 діб [8]. Після завершення культивування робили висів мікроорганізмів на м'ясопептонний агар і після добового культивування аналізували колонії бактерій за морфологічними, культуральними та біохімічними властивостями [2]. Для аналізу ефективності росту культур на синтетичних середовищах вимірювали мікробну біомасу ваговим методом [8].

При виконанні роботи одне з основних завдань – виявити інтенсивність росту даних культур на напівсинтетичних середовищах із тирсою та карбоксиметилцелюлозою (КМЦ), а також здатність цих культур утилізувати в процесі росту цукри; рости на середовищах з різним значенням *pH*; виділяти газ у процесі життєдіяльності.

При створенні модельних напівсинтетичних середовищ як мінеральної основи використовували середовище описане вище, а до нього додавали органічні домішки – КМЦ та деревну тирсу в кількості 62,5 г/л. Суспензії досліджуваних мікроорганізмів, доведені за стандартом мутності до $1 \cdot 10^9$ кл./мл, вносили в об'ємі 5 мл у дві колби з 300 мл напівсинтетичного середовища (відповідно з КМЦ і тирсою). Культивування мікроорганізмів проводили в анаеробних умовах із використанням газовивідної системи у двох температурних режимах (+25 та +45 °С) протягом 14 діб. У період культивування мікроорганізмів визначали динаміку росту, кількість цукрів у середовищах, об'єм виділеного газу [1]. Показники росту досліджуваних культур визначали нефелометричним методом. Зразки культур відбирали на 3, 7, 10 та 14-ту добу культивування. Виміри оптичної щільності проводили на приладі ФЕК-56М при довжині хвилі 590 нм (жовтий світлофільтр), використовуючи кювети на 0,5 мл. Ріст дослідних культур супроводжувався деградацією органічних речовин середовищ (КМЦ та тирси) з утворен-

ням вільних моноцукрів. Кількість цукрів як показник деструкції перевіряли протягом культивування мікроорганізмів, використовуючи методику визначення цукрів за Бертраном. Відбір зразків у кількості 5 мл проводили на 1, 3, 7, 10 та 14-ту доби культивування [3]. Для перевірки здатності газотвірних бактерій рости при різних значеннях *pH* у розроблених модельних напівсинтетичних середовищах створювали різні умови: додавали оцтовий буфер до *pH* 5, фосфатний буфер до *pH* 10 [3]. Культивування бактерій проводили за тими ж температурними режимами. Показники росту мікроорганізмів вимірювали нефелометричним методом на 3, 7, 10 та 14-ту доби культивування. Об'єм газу, виділеного дослідними культурами при культивуванні на експериментальних середовищах, визначали використовуючи газовивідну систему та метод витіснення води.

Враховуючи однакові умови культивування та дослідження обох культур мікроорганізмів, показники росту наводили в одиницях оптичної щільності, об'єм виділеного газу (у см³). Дослідження властивостей газотвірних мікроорганізмів проводили у три етапи:

I етап – виділення мікробів із природних середовищ;

II етап – селективне культивування на бідних синтетичних середовищах із метою отримання штамів із широкими метаболічними потенціями;

III етап – вивчення здатності виділених штамів до деструкції органічних речовин.

Для виділення газотвірних мікроорганізмів отримували ґрунтову витяжку у фізіологічному розчині та готували компост із залишків рослинної маси з додаванням крейди. У результаті інкубації даних природних середовищ в анаеробних умовах протягом 7 діб отримали асоціації мікроорганізмів, здатних рости та розмножуватись у названих середовищах із виділенням газу.

На наступному етапі дослідження вивчалася здатність виділених культур рости на бідних синтетичних середовищах. Компоненти синтетичного середовища підбиралися так, щоб змодельовати умови вирощування бактерій на рештках піролітичної обробки відходів. Таке середовище було селективним і в ньому мали змогу розмножуватись тільки хемотрофні мікроорганізми.

По завершенні культивування бактерій на бідних синтетичних середовищах виділені мікроорганізми досліджували за морфологічними, культуральними, біохімічними властивостями, що дозволило провести їх ідентифікацію за визначником бактерій [6].

Результати та їх обговорення

Мікроорганізми, виділені з компосту, представлені грампозитивними бактеріями (фарбування за Грамом), утворюють ендоспори бацилярного типу, здатні до росту як на простих, так і на бідних середовищах; хемоорганотрофи, у процесі росту здатні утилізувати цукри; анаероби, або факультативні анаероби; у мазках досліджуваних культур спостерігається поліморфізм – наявність коротких і довгих паличок. За цими ознаками бактерії, виділені з компосту, віднесені до роду *Methanobacterium* (надалі культура 1). Мікроорганізми, виділені з ґрунтової витяжки, мають такі ознаки: грампозитивні палички середніх розмірів, ендоспори сферичні, облігатні анаероби та галофіти, хемоорганотрофи, метаболізм бродильного типу, каталазо- та оксидазонегативні, оптимальна температура росту +35...+45 °С. За визначником бактерій [6] вони віднесені до роду *Sporohalobacter* (надалі культура 2).

Після десятиденного глибинного культивування на дослідних синтетичних середовищах отримані культури фільтрували з метою визначення біомаси бактерій. Для бактерій, виділених із компосту, цей показник становив 0,7 мг/мл, а для бактерій із ґрунтової витяжки – 0,5 мг/мл.

Одне із завдань роботи – вивчення здатності отриманих газотвірних мікроорганізмів до деструкції органічних речовин. Із цією метою створені модельні напівсинтетичні середовища, в яких джерелами органічних речовин були деревна тирса та КМЦ. На рисунку 1 наведено графіки, які дають можливість простежити інтенсивність росту виділених бактерій при їх культивуванні на напівсинтетичних середовищах із тирсою та КМЦ. Показником росту культур вважали підвищення оптичної щільності культуральної рідини в процесі вирощування.

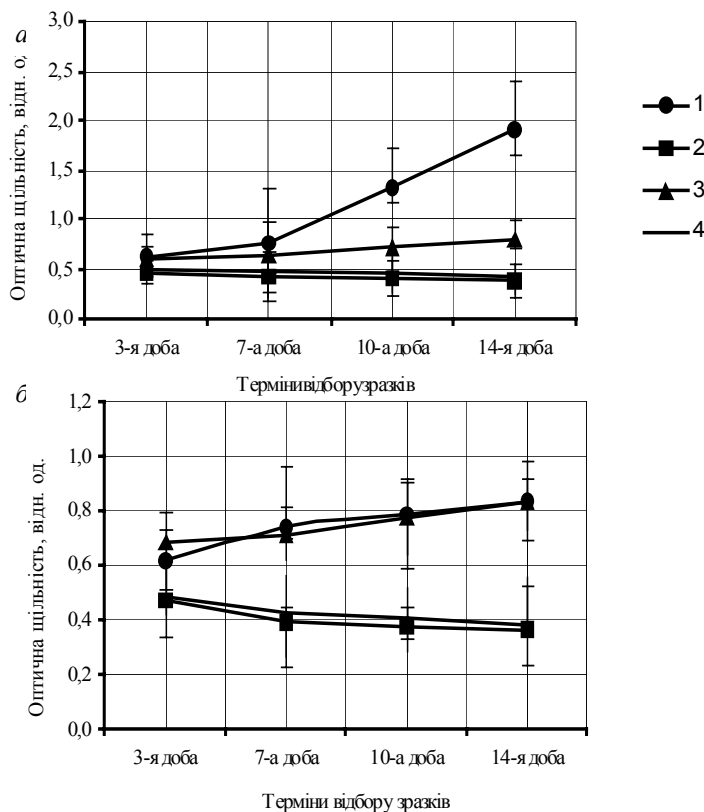


Рис. 1. Показники росту культур 1 (а) і 2 (б) при вирощуванні на напівсинтетичних середовищах із тирсою та КМЦ: 1 – КМЦ, +45 °С, 2 – тирса, +45 °С, 3 – КМЦ, +25 °С, 4 – тирса, +25 °С

Інтенсивніший ріст обох досліджуваних культур спостерігався при вирощуванні на середовищі з КМЦ. Причому культура 1, очевидно, є термотолерантною, оскільки крива її росту при температурі +45 °С мала значно більший підйом порівняно з кривою, отриманою при +25 °С. На середовищі з тирсою практично не спостерігали росту обох досліджуваних культур при обраних температурних режимах. Це може бути пов'язано з відсутністю ферментів, здатних гідролізувати складні біополімерні молекули клітковини.

При вирощуванні дослідних культур на напівсинтетичних середовищах із целюлозовмісними субстратами відбувається їх деструкція з вивільненням глюкози, яка у подальшому утилізується мікроорганізмами. Для визначення споживання цукру виділеними бактеріями вимірювали глюкозу методом Бертрана у процесі культивування. Слід відзначити, що до складу напівсинтетичних середовищ глюкоза не входила та

єдиним її джерелом були тирса і КМЦ. Як видно з рисунка 2 досліджувані культури мікроорганізмів найінтенсивніше споживають цукри на середовищі з КМЦ.

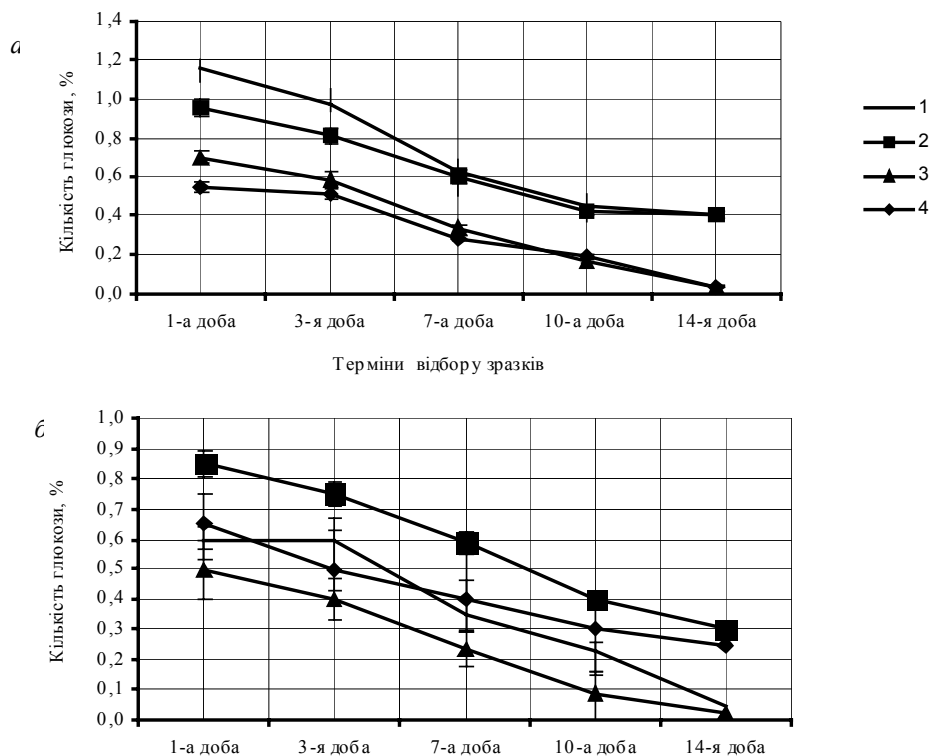


Рис. 2. Утилізація цукрів культурами 1 (а) і 2 (б) при вирощуванні на середовищах із тирсою та КМЦ: позначення див. рис. 1

Таке явище пов'язане з тим, що глюкоза на даному середовищі перебуває у доступнішій формі для мікроорганізмів, ніж на середовищі з тирсою. Це пояснює вищі показники кількості цукру на початку культивування саме на середовищі з КМЦ. Відносно температурних режимів краща динаміка утилізації глюкози для обох культур спостерігалася при +45 °С, а саме, при вирощуванні культури 1 на середовищі з КМЦ кількість спожитої глюкози склала 64 %, а для культури 2 – 92 %. Однак, урахувавши більший приріст біомаси для культури 1, слід відзначити, що її метаболізм збалансованіший. Деяко нижчі показники утилізації цукрів виділеними мікроорганізмами спостерігалися при температурі +25 °С та на середовищі з тирсою.

Велике значення для створення технологій утилізації відходів має підбір оптимальних умов (зокрема pH) для життєдіяльності газотвірних мікроорганізмів-деструкторів. Тому на наступному етапі роботи визначали здатність виділених бактерій рости при різних значеннях pH . Контроль – наростання оптичної щільності культуральної рідини при pH 7 (рис. 3).

Порівняльний аналіз гістограм (див. рис. 3) демонструє відсутність впливу pH на ріст обох культур на середовищі з тирсою. Навпаки, при культивуванні на середовищі з КМЦ показники росту досліджуваних культур значно відрізнялися. Для культури 1 найбільший ріст виявлений при pH 5, а для культури 2 – при pH 10 (показники оптичної щільності при оптимальних pH збільшились відповідно у 2,0 та 1,5 раза порівняно з контролем).

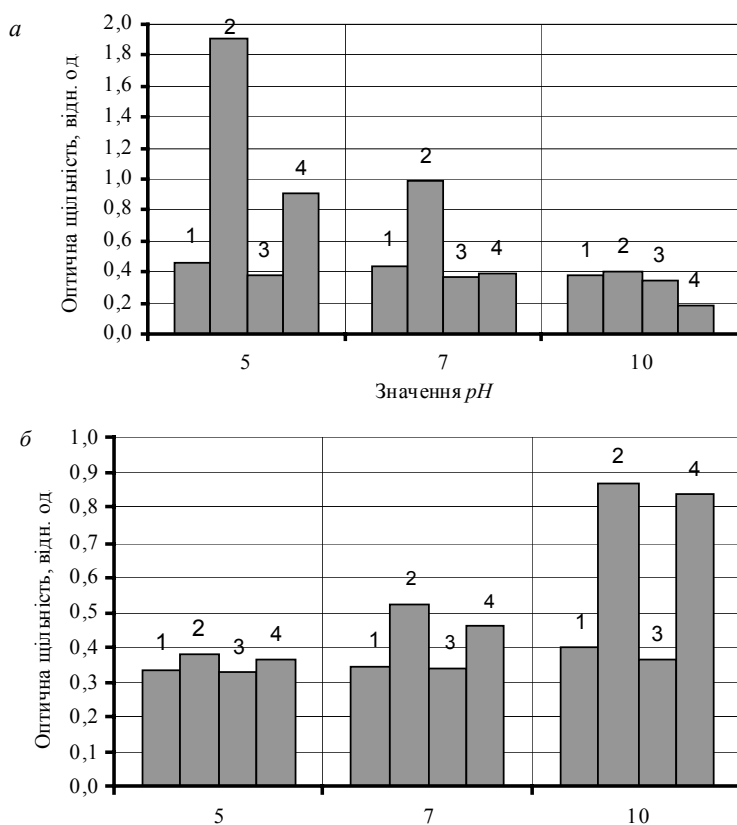


Рис. 3. Ріст культур 1 (а) та 2 (б) на напівсинтетичних середовищах із тирсою та КМЦ при різних значеннях pH : 1 – тирса, +45 °С, 2 – КМЦ, +45 °С, 3 – тирса, +25 °С, 4 – КМЦ, +25 °С

Досліджувані культури здатні в процесі свого росту виділяти газ (рис. 4). Для визначення оптимальних умов газоутворення вимірювали об'єм газу при вирощуванні досліджених культур при двох температурних режимах (+45 і +25 °С) на середовищах із тирсою та КМЦ і нейтральному значенні pH .

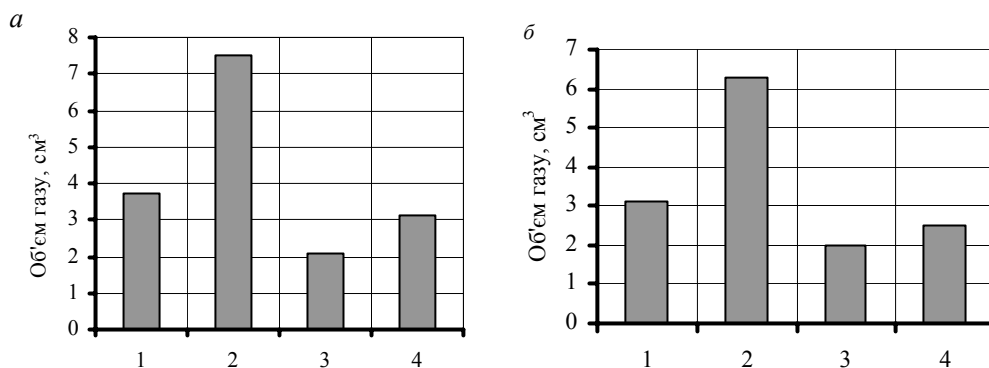


Рис. 4. Показники об'єму виділеного газу дослідними культурами 1 (а) і 2 (б) у процесі культивування на напівсинтетичних середовищах із тирсою та КМЦ: позначення див. рис. 3

Найбільший об'єм газу культури 1 і 2 (див. рис. 4) виділяли при культивуванні на середовищі з КМЦ при температурі +45 °С (відповідно 7,5 і 6,3 см³). При темпера-

турі +25 °С та на середовищі з тирсою кількість виділеного газу була значно меншою. Природу газу буде встановлено в подальшому.

Висновки

Із природних субстратів (компосту та ґрунтової витяжки) виділено два бактеріальні штами – представники родів *Methanobacterium* (культура 1) і *Sporohalobacter* (культура 2). Вони здатні рости на бідних середовищах без додавання органічних речовин, що свідчить про високу метаболічну активність. На розроблених модельних напівсинтетичних середовищах із додаванням КМЦ і тирси встановлено можливість їх використання як біодеструкторів. Отримані культури термотолерантні, оскільки здатні рости при високих температурах, що важливо в умовах переробки відходів. Щодо *pH*, то сприятливіше для росту культури 1 – кисле середовище (*pH* = 5), а для культури 2 – лужне (*pH* = 10). Найкращі показники росту культур спостерігалися при вирощуванні на середовищі з КМЦ і температурі +45 °С, причому культура 1 споживала значно менше глюкози, ніж культура 2. Культура 1 відрізнялася вираженою здатністю до газоутворення. Враховуючи наведене вище, можна рекомендувати використання виділеного штаму метанобактерій (культура 1) для застосування в технології переробки відходів.

Бібліографічні посилання

1. Гальченко В. Ф. Метанобразующие бактерии. – М. : Мир, 2001. – С. 389–464.
2. Гусев М. В. Микробиология / М. В. Гусев, Л. А. Минеева. – М. : Изд-во МГУ, 2004. – 448 с.
3. Данилова Т. Е. Общая биотехнология. Методические указания к выполнению лабораторного практикума. – Ч. 2. – Улан-Уде : Изд-во ВСТГУ, 2007. – С. 70.
4. Родина Е. М. Использование эмиссий метана из отходов для получения биогаза / Е. М. Родина, Ш. А. Ильясов, З. А. Абайханова // Вестник КРСУ. – 2003. – № 6. – С. 3–9.
5. Обоснование комплексных энергетических технологий на полигонах твердых бытовых отходов / В. В. Елистратов, Л. И. Кубышкин, В. И. Масликов, Е. Р. Покровская // Энергетическая политика. – 2001. – Вып. 3 – С. 38–41.
6. Определитель бактерий Берджи / Под ред. Д. Хоулга, Н. Крига, П. Снита, Д. Стейли, С. Уильямса. – 9-е изд. – В 2 т. – Пер. с англ. под ред. Г. А. Заварзина. – Т. 2. – М. : Мир, 1989. – 400 с.
7. Паницхвала Е. С. Метангенерация твердых органических отходов городов / Е. С. Паницхвала, Е. В. Давиденко // Биотехнология. – 1990. – № 4. – С. 49–57.
8. Сеги Й. Методы почвенной микробиологии. – М. : Колос, 1983. – 295 с.
9. A laboratory study of survival of selected microorganisms after heat treatment of biowaste used in biogas plants / L. Sahlström, E. Bagge, E. Emmoth et al. // Bioresource Technology. – 2008. – Vol. 99. – P. 7859–7865.
10. Designs of anaerobic digesters for producing biogas from municipal solid – waste / A. H. Igoni, M. J. Ayotamuno, C. L. Eze et al. // Applied Energy. – 2008. – Vol. 85. – P. 403–438.
11. Enhancement of biogas production by addition of hemicellulolytic bacteria immobilized on activated zeolite / S. Weiß, M. Tauber, W. Somitsch et al. // Water Research. – 2010. – Vol. 44. – P. 1970–1980.
12. Enhancement of biogas production from solid substrates using different techniques – A review / Y. Santosh, T. R. Sreerishnan, S. Kohli, V. Rana // Bioresource Technology. – 2004. – Vol. 95. – P. 1–10.
13. Identification of biogas microbiological community in biogas systems and evaluation of microbial risks from gas usage / B. Vinnerås, C. Schönning, A. Nordin // Science of The Total Environment. – 2006. – Vol. 367. – P. 606–615.
14. Modeling biogas production at landfill site / L. Manna, M. C. Zanetti, G. Genon // Resources, Conservation and Recycling. – 1999. – Vol. 26. – P. 1–14.

Надійшла до редколегії 07.06.2010