


УМАНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

ЯСТРЕМСЬКА ЛАРИСА СЕРГІЇВНА



УДК: 579.64 : 661.155.5 : 62-665.9 (042.3)

**РОЛЬ АНАЕРОБНИХ МІКРООРГАНІЗМІВ У ТРАНСФОРМАЦІЇ
СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКОЇ СИРОВИНИ В БІОПАЛИВО**

03.00.07 – мікробіологія

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата сільськогосподарських наук

Умань – 2008

Дисертацією є рукопис

Робота виконана в Інституті мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України, Національному авіаційному університеті Міністерства освіти і науки України

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор, член-кор. НАН України

Малашенко Юрій Романович

Інститут мікробіології і вірусології ім.Д.К.Заболотного НАН України, завідувач відділу газоокислюючих мікроорганізмів

кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник
Карпенко Валерій Іванович,
Національний авіаційний університет, доцент
кафедри біотехнології

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор, академік УААН

Патика Володимир Пилипович,

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України, завідувач відділу фітопатогенних бактерій

кандидат сільськогосподарських наук, старший науковий співробітник,

Мельничук Тетяна Миколаївна,

директор Південної дослідної станції Інституту сільськогосподарської мікробіології УААН

Захист відбудеться «26» вересня 2008 р. об 11 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 74.844.02 в Уманському державному аграрному університеті за адресою: вул. Інститутська,1, м. Умань, Черкаська обл., Україна 20305

З дисертацією можна ознайомитися в науковій бібліотеці Уманського державного аграрного університету за адресою: вул. Давиденка, 2, м. Умань, 20305, Україна

Автореферат дисертації розіслано: «22» вересня 2008 р

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради

В.П. Карпенко

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Збереження навколишнього природного середовища та одержання енергії є однією з найгостріших проблем сьогодення. Вагомим внеском у її розв'язання може стати використання анаеробних мікроорганізмів, здатних здійснювати біотрансформацію сільськогосподарських, промислових та побутових відходів і стоків. Анаеробіоз є найефективнішим способом їх очищення з одного боку, з іншого – він дає змогу забезпечити трансформацію значної частини органічних речовин в енергоносії та інші корисні продукти. Анаеробна біотехнологія дає можливість залучати до енергетичного банку нові нетрадиційні відновлювані джерела енергії, серед яких на особливу увагу заслуговують відходи сільськогосподарського виробництва, а саме: тваринництва та рослинництва, які відповідають основним вимогам перспективних ресурсів – значному поширенню та відновлюваності. Проблема біоконверсії сільськогосподарських відходів анаеробними мікроорганізмами пов'язана також з необхідністю захисту навколишнього природного середовища від забруднень.

Сировиною для переробки в анаеробних умовах можуть слугувати різні відходи сільськогосподарського виробництва (курячий послід, гній свиней та великої рогатої худоби, трава, солома, бадилля тощо), які містять органічну речовину. Біоконверсією сільськогосподарської сировини можна одержати корисні продукти – біопаливо (етанол, метан, водень), органічні кислоти (ацетат, пропіонат, бутират), вітаміни групи В, промислово важливі ферменти (целюлази, геміцелюлази тощо).

Анаеробна деградація біополімерів здійснюється багатовидовою мікробною асоціацією, яка об'єднується міцними трофічними зв'язками. Обов'язковими компонентами спільноти є первинні анаероби гідролітичної мікрофлори (гідролізують біополімери), бродильної мікрофлори (зброджують молекули мономерів), ацетогенної мікрофлори (перетворюють різноманітні продукти бродіння в субстрати метаногенезу) і вторинні анаероби – метанутворюючі археї (Г.А. Заварзін, 2001, Й. Лейгелер зі спів., 2005).

Проте питання поширення первинних і вторинних анаеробів у різних екосистемах, їх можливий вплив на навколишнє природне середовище, зв'язки в цій спільноті, селекція чистих анаеробних культур, створення нових асоціацій, вивчення їх фізіолого-біохімічних властивостей є доволі складним і здебільшого ще не з'ясованим.

Інтерес до цієї проблеми останнім часом значно зріс у зв'язку з впровадженням екологічних біотехнологій та світовою енергокризою. Тому проблема біотрансформації відходів сільськогосподарських та інших виробництв є актуальною та має теоретичне і практичне значення.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційну роботу виконано за планами комплексних тем науково-дослідної роботи Інституту мікробіології і вірусології НАН України та факультету екологічної безпеки кафедри біотехнології Інституту міського господарства Національного авіаційного університету за напрямками: «Провести науково-дослідні роботи по біологічним особливостям іммобілізованих клітин метаногенів» номер держреєстрації 0182.7010.980, шифр: 2.28.10.6, 0.01.08.НЗ; «Мікробіологія і біотехнологія анаеробної конверсії біомаси в паливо та інші цінні продукти» номер держреєстрації

01.86.0.072.643, шифр: 2.30.2.5; держбюджетною темою кафедри біотехнології ФЕБ ІМГ НАУ № 15/10.02.05 «Теоретичні і практичні основи культивування асоціацій мікроорганізмів на відходах виробництв в біопаливо».

Мета і завдання дослідження. Мета роботи – розроблення науково-методичних засад використання анаеробних термофільних (целюлолітичних, сахаролітичних і метанутворюючих) мікроорганізмів для біотрансформації сільськогосподарської сировини в біопаливо.

Виходячи з поставленої мети, основними завданнями досліджень були:

- виділення накопичувальних і чистих культур облигатних анаеробних мікроорганізмів з різних екосистем (прісних і солоних водойм, сільськогосподарських, побутових та виробничих відходів);
- вдосконалення методів і засобів культивування облигатних анаеробів;
- ідентифікація культур термофільних анаеробних мікроорганізмів;
- дослідження факторів, що впливають на процес анаеробної біотрансформації сільськогосподарської сировини виділеними мікроорганізмами;
- оцінка економічної ефективності трансформації субстратів виділеними культурами;

Об'єктом дослідження є процес трансформації анаеробними термофільними мікроорганізмами сільськогосподарської сировини в біопаливо.

Предметом дослідження є фізіолого-біохімічні показники анаеробних мікроорганізмів за різних шляхів оптимізації біотехнологічного процесу сільськогосподарської сировини.

Методи дослідження: мікробіологічні, фізико-хімічні методи при вивченні целюлолітичних, сахаролітичних і метанутворюючих мікроорганізмів у лабораторних, промислових біогазових установках, а також методи математичної обробки даних.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше виділено та ідентифіковано нові штами облигатних анаеробних термофільних целюлолітичних, сахаролітичних та метаногенних бактерій – *Clostridium thermocellum* 5CT, *Clostridium thermosaccharolyticum* 1S, *Methanobacterium* sp.13M, *Methanosarcina* sp. 84 MS, які утилізують сільськогосподарську та іншу сировину.

Для *Clostridium thermocellum* 5CT і *C.thermosaccharolyticum* 1S встановлено оптимальний рівень окисно-відновного потенціалу (ОВП), що становить –260 мВ і –140 мВ відповідно, який визначає інтенсивність процесів біосинтезу культур для потреб утилізації відходів сільськогосподарського виробництва.

Встановлено можливість регуляції процесів біосинтезу *C.thermocellum* 5CT, *C.thermosaccharolyticum* 1S екзогенним воднем. Підвищення концентрації водню супроводжується збільшенням кількості етанолу вдвічі і зниженням продукування ацетату втричі.

Показано, що *C.thermocellum* 5CT та *C.thermosaccharolyticum* 1S резистентні щодо дії етанолу у концентрації 2%. *C. thermocellum* 5CT містить активний комплекс целюлазних ферментів, який стійкий щодо дії кисню.

На основі виділених монокультур бактерій створено асоціації анаеробних мікроорганізмів та встановлено оптимальне співвідношення монокультур, яке дає змогу впливати на вихід кінцевих продуктів метаболізму – метану, етанолу, ацетату при трансформації сільськогосподарської сировини.

Уперше встановлено стимулюючий вплив магнітного поля на процес мікробної трансформації органічних відходів сільськогосподарського та інших виробництв у біопаливо.

Практичне значення одержаних результатів. Анаеробні мікробні асоціації рекомендовано використовувати в процесах перероблення сільськогосподарських і побутових відходів на метан, водень, етанол, а також на органічні кислоти – ацетат, пропіонат, бутират та інші корисні продукти.

Монокультури анаеробних мікроорганізмів рекомендовано використовувати у прикладних науково-дослідних роботах як потенційні продуценти термостабільних ферментів.

Розроблено спосіб інтенсифікації синтезу метаболітів з органічних речовин сільськогосподарського та інших виробництв анаеробно-аеробними асоціаціями мікроорганізмів при магнітному обробленні (патент на корисну модель № 11993 від 11.02.08).

Модифіковані методи та розроблені пристрої для культивування бактерій рекомендовано використовувати для виділення та дослідження облигатних анаеробів. Зазначені пристрої впроваджено у міжрегіональному інституті альтернативних технологій «Альтек».

Впроваджено науково-технічну розробку «Використання іммобілізованих клітин мікроорганізмів для інтенсифікації очищення стічних вод тваринницьких комплексів і отримання біогазу» у НВО ім. М.В.Фрунзе, м. Суми.

Матеріали і результати дисертації використовують на факультеті екологічної безпеки Інституту міського господарства Національного авіаційного університету у лекційних курсах та лабораторних роботах дисциплін з мікробіології, утилізації та рекуперації відходів.

Особистий внесок здобувача. Особиста участь дисертанта полягала в розробленні та удосконаленні методичних підходів щодо виконання поставленої мети, експериментальному її обґрунтуванню, критичному аналізу літературних даних, узагальненню одержаних результатів, статистичному обробленню цифрового матеріалу.

Основні експериментальні дані, одержані здобувачем особисто: проведено виділення та ідентифікацію анаеробних термофільних мікроорганізмів, визначено вплив метаболітів на ріст анаеробів при трансформації органічної сировини в біопаливо, вивчено особливості впливу окисно-відновного потенціалу середовища на фізіологічний стан гідролітичної мікрофлори, здійснено оцінку чутливості целюлолітичного штаму 5СТ щодо молекулярного кисню, виявлено особливості культивування монокультур та характер взаємодії між створеними з них асоціаціями анаеробних термофільних мікроорганізмів.

Виділення та селекцію анаеробних мікроорганізмів з різних екосистем проведено під керівництвом д.б.н, проф. В.О. Романовської, модифікацію пристроїв та методів для анаеробного культивування здійснено за участі к.м.н. Д.В. Чернишенка, д.т.н. О.Б. Таширева (Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України, Київ), оптимізацію процесу переробки сільськогосподарської сировини, дослідження з використанням магнітів для інтенсифікації процесу трансформації органічних речовин у біопаливо – за участі к.б.н. В.І. Карпенка (Інститут міського господарства НАУ, Київ), які є співавторами відповідних публікацій.

них публікацій.

Постановку завдань, обговорення одержаних результатів, їхнє узагальнення та підготовку публікацій за результатами досліджень проводили спільно з науковими керівниками д.б.н., проф., член-кор. НАНУ Ю. Р. Малашенком та к.б.н., ст.н.с., доцентом В. І. Карпенком.

Апробація результатів дисертації. Результати науково–дослідної роботи доповідались здобувачем на Всесоюзному симпозиумі «Біоконверсія рослинної сировини» (Рига, 1982), Міжнародному симпозиумі «Біоконверсія сонячної енергії» (Пушино, 1983), IV симпозиумі соцкраїн з біотехнології (Болгарія, 1986), на конференції «Мікробіологічні методи захисту навколишнього середовища» (Пушино, 1988), 10-th Congress of the Hungarian Society of microbiology 1987, VII з'їзді Українського мікробіологічного товариства (Чернівці, 1989), Symposium on biotechnology for fuels and chemical (Colorado Springs, USA, 1989), VIII міжнародній конференції «ABIA 2007» (Київ, 2007), VI науково-практичній конференції «Безпека життя і діяльності людини – освіта, наука, практика» (Київ, 2007), міжнародній конференції «Сучасні проблеми біології, екології та хімії» (Запоріжжя, 2007). Здобувач брала участь у тематичній виставці «В.І. Вернадський і сучасна наука» (ВДНГ м. Москва), на якій за розробку і впровадження високопродуктивної біоенергетичної установки «Біогаз 301С» відзначена срібною медаллю.

Публікації. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 22 наукові праці, з яких 7 статей у фахових виданнях, 12 тезах та 1 патенті.

Структура й обсяг роботи. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів дослідження, викладу результатів та їх обговорення, висновків, рекомендацій і впроваджень у виробництво, додатків, списку літературних джерел. Роботу викладено на 138 сторінках, містить 43 рисунки та 22 таблиці. Список використаних джерел включає 230 найменувань (з них – 155 латиницею).

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ ДИСЕРТАЦІЇ ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

У розділі подано аналіз наукових джерел вітчизняних і зарубіжних авторів з вивчення анаеробних мікроорганізмів, які здійснюють деструкцію органічних речовин в енергоносії. Описано їх розповсюдження у природі, біологічні і біохімічні властивості та використання у різних біотехнологіях. Велика увага приділяється питанням трансформації сільськогосподарської сировини анаеробними термофільними мікроорганізмами у біопаливо.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Зразки торфу, ґрунту, води й мулу прісних водойм відбирали загальноприйнятими методами: осади та воду морів – пробовідбірниками на експедиційних судах. Накопичувальні анаеробні мікроорганізми одержували при засіві поживних середовищ, водою, мулом та ґрунтом із джерел з температурою 20, 30, 55, 60°C та рН 6,0–8,0.

Для селекціонування культур застосовували техніку анаеробного культивування. Експерименти проводили на розробленому нами мінеральному середовищі "Р", (г/л): KH_2PO_4 – 0,4; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ – 0,4; NH_4Cl – 1,0; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,02; NaHCO_3 – 1,0; $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; розчин 0,2% резазурину – 1

мл; розчин мікроелементів – 1 мл/л; розчин вітамінів (Е. Wolin, 1963) – 1 мл/л; вітаміни в ряді випадків заміняли дріжджовим екстрактом – 2 мл/л; вода дистильована – 1 літр; рН середовища 7,0–7,5. Окремо готували робочий розчин індикатору резаурину й розчини відновлювачів (Т.Н. Жилина, 1978). Цитрат титану Ш готували за (А.І.В. Zehnder, 1976), сірководень – (А.Б.Таширевіч, 1988). Середовище із сухого курячого посліду готували 1%-ю концентрацією.

Середовища розливали у флакони об'ємом 30, 250, 500 мл, закривали пробками з бутилової гуми з різьбовими металевими ковпачками та в пробірки. Газові суміші вводили в культиватор у співвідношенні 4:1. Стерилізацію поживних середовищ проводили при 1,5 атм у металевому біксі.

При виділенні целюлолітичних культур, як ростовий субстрат застосовували целюлозу (1%) або целобіозу (0,5%). Для сахаролітичних бактерій – целобіозу (0,5%) або глюкозу (1%). Виділення культур проводили з ділянок гідролізованого фільтрувального паперу. При визначенні субстратної специфічності целюлолітичних і сахаролітичних штамів використовували різні субстрати цукрів у 10%–і концентрації. Целюлазну активність вимірювали за утворення цукрів, що редукують, при гідролізі целюлози (фільтрувального паперу) з використанням реактивів Шомоди й Нельсона (Методы общей бактериологии, 1984).

Як джерело вуглецю для виділення метаногенів використовували: суміш водню й вуглекислого газу в співвідношенні 4:1; метанол – 5 мл/л; ацетат натрію, форміат натрію, метиламіни по 1,5 г/л. Для одержання чистих культур метаногенів використовували антибіотики (0,12 г/л): кефзол, ампіокс, натрій бензилпеніцилін.

Для виділення чистих культур з накопичувальних застосовували метод серійних розведень з наступним висівом на агаризовані середовища у чашки Петрі, пробірки, чи "оберткові" флакони. Час вирощування культур 5–7 діб, температура культивування – 55, 60°C. Чистоту культур визначали за однорідністю колоній на щільних середовищах і морфологічній однорідності при мікроскопіюванні. Чистоту метаногенів – за відсутністю росту і метаноутворення на пептоно-глюкозному середовищі.

Ріст культур оцінювали за величиною оптичної густини клітинної суспензії, яку визначали на фотоелектроколориметрі ФЭК-56П, при $\lambda=540$ нм, а також за виділенням газів – H_2 , CO_2 , CH_4 . Ріст целюлолітичних бактерій визначали також візуально за ступенем руйнування целюлози (фільтрувального паперу).

Морфологію клітин вивчали на мікроскопі МБІ-6 у фазовому контрасті ($\times 1570$). Фарбували клітини за Грамом згідно з загальноприйнятими методами (Методы общей бактериологии, 1984). Розрідження желатину спостерігали в його стовпчиках на основі середовища «Р». Утворення індолу й сірководню визначали якісно. Відновлення нітрату досліджували на середовищі з $NaNO_3$ у концентрації 0,01–1 г/л і 0,5% целобіозою. Утворення нітриту визначали за допомогою сульфанілової кислоти та диметил- α -нафтиламіну. Білок визначали методом Лоурі. Азот NO_3^- – реактивом Грися, азот NO_2^- – методом Граньвань–Ляжу, азот NH_4^+ – реактивом Несслера, фосфор – методом Фіске–Суббароу, органічний вуглець – методом Тюріна (Методы общей бактериологии, 1984). Катіони (Na^+ , K^+ , Mg^{2+} ...тощо) визначали на атомно-адсорбційному електрофотометрі С-302.

ДНК виділяли за методом Мармура (Методы общей бактериологии, 1984) з клітин лізованих лізоцимом. Вміст гуаніну й цитозину (мол.%) у ДНК встановлюва-

ли шляхом визначення її температури плавлення. Криву плавлення ДНК одержували за допомогою електрофотометра DU-8.

Склад газів аналізували на газовому хроматографі ЛХМ-8МД, визначення жирних кислот і спиртів – на хроматографі "Chrom-5". Об'єм проб – 5-10 мкл.

Для потенціометричного визначення значень окисно-відновного потенціалу (ОВП) та рН середовищ використовували іономер універсальний ЕВ-74 з платиновим електродом ЕВП-1 та хлоросрібним електродом порівняння ЕВЛ-ІМЗ.

Штами мікроорганізмів, що досліджували, ідентифікували за 9-м виданням «Определитель бактерий Берги» та оригінальними роботами.

МОДИФІКОВАНІ ПРИСТРОЇ І МЕТОДИ АНАЕРОБНОГО КУЛЬТИВУВАННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ

Крім загальноприйнятих методів та пристроїв, описаних у літературі, для виділення облигатних анаеробних мікроорганізмів з метою утилізації сільськогосподарської продукції було розроблено власні пристрої: культиватор для визначення параметрів росту анаеробів, газовий зонд-фіксатор для видалення кисню з культиваторів і пробірок, пристрій для «холодної» стерилізації термолабільних речовин в анаеробних умовах, скляний анаеростат для культивування анаеробних мікроорганізмів на щільних середовищах. Розроблені пристрої і методи анаеробного культивування враховують специфіку роботи з мікроорганізмами в анаеробних умовах, дають змогу проводити фундаментальні дослідження з виділення чистих культур анаеробних мікроорганізмів у стерильних умовах, вивчати їх фізіолого-біохімічні властивості, отримувати достовірні, добре відтворювані результати.

ПОШИРЕННЯ ЦЕЛЮЛОЛІТИЧНИХ І МЕТАНУТВОРЮЮЧИХ МІКРООРГАНІЗМІВ У РІЗНИХ ЕКОСИСТЕМАХ

Було проведено обстеження низки екосистем з метою визначення місць існування первинних – целюлолітичних і вторинних – метанутворюючих бактерій. Було відібрано близько 300 проб у Кримській, Запорізькій, Кіровоградській та інших географічних зонах. Екосистеми, що досліджували, включали: прісні водойми (р. р. Дніпро, Луга), солоні водойми (Сакський лиман, озеро Сиваш, Чорне та Біле моря), сільськогосподарські та побутові відходи, ґрунти. Зразки для виділення целюлолітичних і метанутворюючих бактерій розрізнялися за рядом фізико-хімічних параметрів: ступенем загальної мінералізації, вмістом NaCl і мікроелементів, рН та температурним режимом.

У пробах Чорного моря активний метаногенез спостерігали у зразках з недостатнім водообміном і сприятливими умовами анаеробіозу. У пробах води Білого моря, де загальна мінералізація морської води становила 30–35 г/л, рН води змінювалось від 6,7 до 8,1 з перевагою лужних значень (8,0), наявність целюлолітичних і метанутворюючих бактерій незначна. Обстеження екотипу тундрової зони Західного Сибіру виявило, що процес кругообігу метану в цих водоймах відбувається на низькому рівні й майже виключно в донних відкладеннях.

Серед екосистем, де активно відбуваються процеси утворення метану, важлива роль належить сільськогосподарським, побутовим та виробничим стокам. Особливістю цих екосистем є висока концентрація органічних речовин, відносно швидке споживання їх мікроорганізмами, а також постійна температура (у

метантенку). Ці умови спричиняють масовий розвиток усіх організмів ланцюга анаеробного розкладання органічних речовин, включаючи метаногени.

Із 300 досліджуваних зразків було виділено накопичувальні анаеробні культури (80 целюлолітичних та 65 метаногенних), що трансформують C_1 – C_2 органічні сполуки, целюлозу, гній, послід у біопаливо.

Метанутворюючі археї виділено на всіх субстратах, що використовують метаногени для росту і метаболізму – ацетаті, метанолі, метиламіні, водень-вуглекислотній суміші.

Найактивніший ріст накопичувальних культур з утворенням метану спостерігали на середовищі «Р» з водень-вуглекислотою сумішшю, метанолі, форміаті, целюлозі, посліді. Слабкий – з використанням метиламіну. З солоних водойм (Чорне море) виділено помірні галофіли з концентрацією $NaCl$ –10–15г/л (табл.1).

Целюлолітичні бактерії, що здатні до гідролізу рослинної сировини, виділені з солоних водойм, мулу метантенку, пташиного посліду, ґрунту. Серед них – представники психрофільних (20–22°C), мезофільних (30–40°C) і термофільних (50–70°C) груп мікроорганізмів. рН середовища 6,0–8,0. Культури подібні за синтезованими продуктами метаболізму: етанолом, ацетатом, лактатом, воднем, вуглекислою. Активне газоутворення (CH_4 , H_2 , CO_2) спостерігали у досліджених зразках мулу метантенку при температурі 55–70°C.

Отримані дані свідчать про значну видову різноманітність анаеробних целюлолітичних та метанутворюючих мікроорганізмів. Порівняльна оцінка наявності метанутворюючих і целюлолітичних мікроорганізмів у різних природних екосистемах показала, що присутність їх взаємозалежна тому, що продукти трансформації первинних анаеробів є субстратами для росту метаногенних археїв.

Таким чином, з різних екосистем (солоні та прісні водойми, сільськогосподарські, побутові відходи) виділено накопичувальні культури анаеробних мікроорганізмів, що трансформують C_1 – C_2 органічні сполуки, целюлозу, гній, послід у біопаливо.

ХАРАКТЕРИСТИКА ТЕРМОФІЛЬНИХ АНАЕРОБНИХ МІКРООРГАНІЗМІВ МЕТАНТЕНКА

З активного мулу метантенка станції біологічного очищення стічних вод (СБО, Бортничі, м. Київ) було відселекціоновано активну термофільну накопичувальну культуру, що стабільно гідролізувала целюлозу до метану за 5–7 діб за температури культивування 60°C. З накопичувальної метаногеної культури, надалі було ізольовано штами: первинних анаеробів, що гідролізують целюлозу (целюлолітичні бактерії), бродильних (сахаролітичні бактерії) і вторинних анаеробів – метанутворюючих археїв.

Характеристика целюлолітичного штаму 5СТ : Прямі, ледве вигнуті палички розміром 0,5–0,6×1,5–2,5 мкм, поодинокі, парні або в ланцюгах до 10 мкм. Грамнегативні. За несприятливих умов культивування (рН нижче 6,4, температура понад 70°C) утворюють термінально розташовані ендоспори. На поверхні щільного середовища культура утворює дрібні, круглі, білі або прозорі колонії розміром 1–2 мм. У глибині целобіозного агару – колонії бобовидні, білі. Облігатний анаероб. Росте в діапазоні температур 45–65°C, оптимальна температура культивування –

Таблиця 1

Характеристика селекціонованих анаеробних культур

№ зразка	Екосистеми	t °C	рН	NaCl 10-15 г/л	Субстрати						целюлоза 10 г/л	послід 10 г/л	Селекціоновані культури
					метил-аміни 1,5 г/л	метанол 5 г/л	ацетат-Na 1,5 г/л	форміат Na 1,5 г/л	H ₂ :CO ₂ 4:1				
7	Солоне водоймище вода	30	6,0-7,8	+	+	-	-	-	-	-	+	-	159МЧ
7	-//-	-//-	-//-	сл.	-	-	+	н.в.	-	-	сл.	-	161ФЧ
8	-//-	-//-	-//-	сл.	+	-	-	-	-	-	сл.	-	165МЧ
6	-//-	-//-	-//-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	41МЧ
9	-//-	-//-	-//-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	25ГЧ
11	-//-	20	-//-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	8Ч
12	-//-	-//-	-//-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	1ГЧ
18	-//-	-//-	-//-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	2Ч
19	-//-	-//-	-//-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	5Ч
22	-//-	-//-	-//-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	6Ч
25	-//-	-//-	-//-	+	сл.	-	-	-	-	+	+	-	9Ч
54	Мул метангенка	60	6,0-7,5	-	-	-	-	сл.	+	+	-	-	13М
54	-//-	55	6,0-7,5	-	сл.	+	+	-	+	+	+	+	5Ц
54	-//-	70	6,0-7,5	-	-	+	+	-	-	-	+	н.в.	81Ц
55	Пташиний послід	30	7,0	-	-	-	-	-	-	-	+	+	70П
54	Мул метангенка	60	6,0-7,5	-	-	-	-	+	+	+	+	+	25ФС
55	Ґрунт теплиць	30	6,5-8,0	-	-	сл.	+	сл.	н.в.	н.в.	+	+	16М
55	-//-	50	6,5-8,0	-	н.в.	+	+	сл.	+	+	+	+	18М
31	Прісна водойма	20	6,5-8,0	-	н.в.	-	-	н.в.	+	+	+	сл.	2ПТ
54	Стічні води	55	6,0-7,8	+	-	-	-	-	+	+	+	-	26ТМ

Примітка: «+» – активний ріст після 6-10 пасажив; «-» – відсутність росту; «сл.» – сліди; «н.в.» – не визначали

55–60°C. Оптимальне значення рН 7,0–7,5, ріст не спостерігається при рН понад 8,0 і нижче 6,5.

При вивченні здатності виділеного штаму використовувати для росту різні джерела вуглецю встановлено, що штам 5СТ здатний ферментувати крім целюлози і целобіози також арабінозу, глюкозу, галактозу, сахарозу, ксилозу, слабо – фруктозу. На живильних середовищах МПА, МПБ, КПА не росте. Ріст спостерігали на мінеральному середовищі "Р" з дріжджовим екстрактом або вітамінами. На рідкому середовищі з целюлозою культура утворює жовтий пігмент. Ця властивість втрачається за багаторазових пересівах, але здатність гідролізувати целюлозу зберігається. При рості на целобіозі, глюкозі, фруктозі проявляється слабка пігментація. Індол не утворюється. Каталаза й оксидаза – відсутні. Основними екзометаболітами є водень, вуглекислий газ, етанол, ацетат та лактат. Желатину не розріджує, нітратів не відновлює. Значення показника вмісту нуклеотидів Г+Ц у ДНК становить 39,04 моль %.

Характеристика сахаролітичного штаму 1S: Рухомі палички, поодинокі, парні або утворюють довгі ланцюги. Штам 1S має розміри клітин: 0,6–0,8×3,0–5,0 мкм. В експоненціальній фазі росту – негативна реакція при фарбуванні за Грамом, при переході в стаціонарну фазу – грампозитивна. На середовищі з целобіозою (22–30 год) та на середовищі з ксилозою або арабінозою (10 год)– утворює термінальні, круглі спори. Поверхневі колонії біло-кремові, блискучі, опуклі, 1–2 мм у діаметрі, з рівними краями. Глибинні колонії – дрібні, ланцетоподібні. Облігатний анаероб. Росте в діапазоні температур 45–70°C, оптимальна температура – 55–60°C. Оптимальне значення рН 7,0–7,3. Ріст не спостерігається при рН нижче 5,0 і понад 8,0.

Штам 1S росте на середовищі "Р" з додаванням дріжджового екстракту або вітамінів. Використовує різні джерела вуглецевого живлення: глюкозу, фруктозу, целобіозу, сахарозу, крохмаль, галактозу, лактозу, рибозу, маннозу, мальтозу, ксилозу, арабінозу. Не використовує: целюлозу, саліцин, манітол, ескулін, амігдалін. Основними продуктами ферментації є водень, вуглекислий газ, ацетат, етанол, бутират, лактат, у незначних кількостях утворює пропіонат. Желатину не розріджує, індолу не утворює, нітратів не відновлює. Вміст нуклеотидів Г+Ц у ДНК становить 31,9 моль%.

На підставі фізіолого-біохімічних і морфолого-культуральних ознак ізольовані штами 5СТ й 1S віднесено до роду *Clostridium*.

Властивості дослідженого штаму 5СТ порівнювали з властивостями термофільних клостридій, здатних гідролізувати целюлозу та її похідні – *Clostridium thermocellum*, *C.stercorarium*, *C.cellulosi*, *C.thermocopriae*, *C.sraminisolvens*. За більшістю ознак, виділений штам 5СТ більш подібний до *C.thermocellum*. Однак, на відміну від типового штаму *C.thermocellum*, штам 5СТ ферментує ширше коло субстратів (арабінозу, галактозу, сахарозу, глюкозу, слабо – фруктозу). Значення показника вмісту нуклеотидів Г+Ц у ДНК підтвердило належність дослідженого нами штаму до даного виду, для якого значення Г+Ц у ДНК перебуває в межах 38–40 моль %.

Властивості штаму 1S порівнювали з властивостями сахаролітичних бактерій *C.thermosaccharolyticum*, *C.thermobutyricum*, *C.thermohydrosulfuricum*. Найближче штам 1S до *C.thermosaccharolyticum*, але штам 1S утворює (крім етанолу, ацетату,

бутирату) пропіонат при рості на середовищі з целобіозою. Вміст Г+Ц у ДНК штаму 1S становить 31,9 моль %, що дало змогу віднести його до виду *Clostridium thermosaccharolyticum*.

Характеристика метанутворюючого штаму 13M: Клітини штаму 13M – палички, розміром 0,5–0,6×7–100 мкм, вигнуті, утворюють ланцюги до 100мкм. Грампозитивні, нерухомі. Поверхневі колонії опуклі, з рівним краєм, коричнюваті, округлої форми, 1–2 мм у діаметрі. У рідкому середовищі культура росте у вигляді опалесцентної суспензії. Ріст та утворення метану штамом 13M спостерігали на мінеральному середовищі "Р" з водень-вуглекислотою сумішшю як єдиним джерелом вуглецю й енергії. Ріст відсутній на середовищі з ацетатом, форміатом, метанолом, метиламінами. Облігатний анаероб. Ріст й утворення метану відбувається в діапазоні температур 40–65°C, з оптимумом 55–60°C. Діапазон рН 6,5–8,0, оптимальне рН 7,0–7,5. Ріст стимулюється внесенням у середовище дріжджового екстракту.

Порівняння діагностичних ознак штаму 13M з описаними термофільними метаногенами дало змогу віднести його до роду *Methanobacterium*.

Характеристика метанутворюючого штаму 84MS: Клітини штаму – коки (1–2 мкм у діаметрі), які розмножуються дробленням у різних напрямках і поєднуються по 2, 4, 8 у сарциноподібні нерухомі пакети (біотип I). Колонії на щільному середовищі – зернисті, жовтуватого кольору 0,5–1 мм у діаметрі. Облігатний анаероб. Ріст та утворення метану штамом 84MS спостерігали на мінеральному середовищі "Р" з субстратами: метанолом, ацетатом, метиламінами, повільно– на водень–вуглекислотній суміші. Росте в діапазоні температур 30–60°C, з оптимумом 55°C; при значеннях рН від 6,0 до 8,0 з оптимумом 6,8–7,0. Ріст і метанутворення стимулювали додаванням дріжджового екстракту. Порівняння властивостей виділеного штаму 84MS з відомими термофільними метаногенами дало змогу віднести його до роду *Methanosarcina*.

Таким чином, з термофільного метаногенного біоценозу активного мулу метантенка ізольовано термофільні анаеробні штами мікроорганізмів, які можуть трансформувати складні органічні речовини в біопаливо. На підставі морфолого-культуральних та фізіолого-біохімічних властивостей виділені штами ідентифіковано як *Clostridium thermocellum* 5CT, *Clostridium thermosaccharolyticum* 1S, *Methanobacterium* sp. 13M, *Methanosarcina* sp. 84MS.

ФАКТОРИ, ЩО ВПЛИВАЮТЬ НА ПРОЦЕС ТРАНСФОРМАЦІЇ ОРГАНІЧНИХ РЕЧОВИН В РЕАКТОРАХ

Неможливо однозначно визначити характер взаємовідносин у бактеріальному ценозі, що складається більш, ніж з двох видів. Тип взаємовідносин усередині спільноти може змінюватись залежно від багатьох факторів (рН, окисно-відновного потенціалу (ОВП), продуктів метаболізму, целюлазної активності та ін.), що впливають на увесь процес трансформації органічних речовин, тому визначення оптимальних параметрів анаеробного розкладання субстрату та ефективне керування цим процесом є важливим з теоретичної і практичної точки зору.

Одним із ключових параметрів анаеробного процесу при трансформації складних біополімерів поряд з рН і температурою є окисно-відновний потенціал середовища, що може впливати на хід метаболічних процесів. Оскільки

лімітуючим фактором при анаеробній трансформації органічних речовин є діяльність первинних анаеробів, було вивчено вплив окисно-відновного потенціалу на фізіологічний стан гідролітичної мікрофлори. Для створення відновлювальних умов було використано сполуки, що володіють електрондонорними властивостями (відновлювачі) – сульфід натрію ($\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$), цитрат титану (III). Динаміку розвитку штамів досліджували залежно від наявності або відсутності в середовищі екзогенних донорів електронів. Вихідне значення ОВП поживного середовища, з 0,5% целобіозою, після дегазування в струмі аргону становило +100 мВ, рН 7,0–7,3.

Встановлено, що розвиток штамів первинних анаеробів відбувається у різних межах значень ОВП з різними оптимумами. Значення ОВП целюлолітичного штаму *C.thermocellum* 5СТ знаходяться в межах –200...–380 мВ, з оптимумом –260 мВ (рис.1,2).

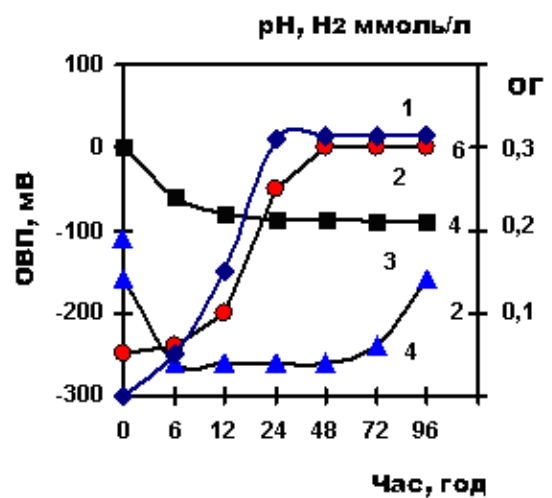
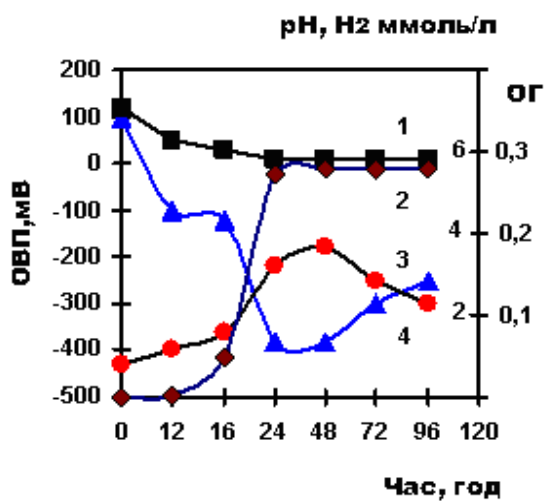


Рис.1. Динаміка росту *C. thermocellum*

5СТ на середовищі без відновника: 1– рН; 2– H_2 ; 3– оптична густина (ОГ); 4– ОВП

Рис. 2. Динаміка росту *C. thermocellum*

5СТ на середовищі з відновником: 1– H_2 ; 2 – оптична густина; 3 – рН; 4 – ОВП

Значення ОВП *C.thermosaccharolyticum* 1S спостерігається у межах ОВП +100...–200 мВ, з оптимумом –135...–140 мВ (рис. 3,4). При оптимальних значеннях ОВП в обох штамів приріст біомаси, продукція етанолу та ацетату на середовищі з відновником (сульфідом натрію) у 1,5–2 рази вищий, ніж на середовищі без відновника.

Наднизькі значення потенціалу, створені введенням у середовище цитрату титану (III), пригнічують процес утворення водню у 6 разів порівнянно з кількістю водню, що утворився при рості *C.thermocellum* 5СТ на середовищі без відновника, але не впливають на утворення біомаси (рис. 5).

Можна припустити, що окисно-відновний потенціал є одним з основних факторів, що визначає фізіологічний стан клітин, і відповідно, інтенсивність процесів біосинтезу.

Визначення впливу молекулярного кисню на розвиток *C. thermocellum* 5СТ показало, що введення молекулярного кисню (0,6–2,32 ммоль $\text{O}_2/\text{л}$) спричиняє припинення виділення водню і супроводжується підвищенням ОВП середовища.

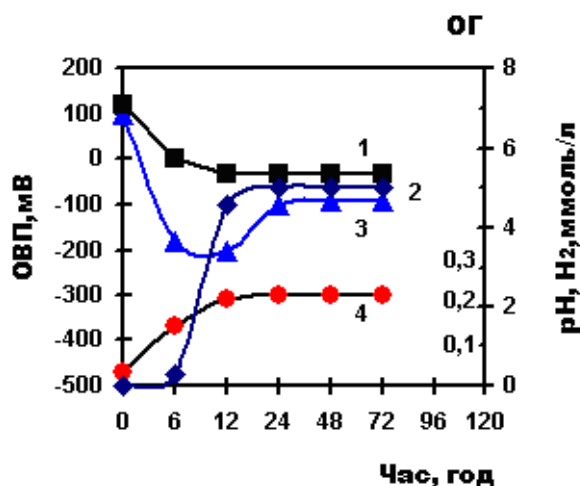


Рис. 3. Динаміка росту *C.thermosaccharolyticum* 1S на середовищі без відновника: 1– рН; 2– Н₂; 3– ОВП; 4– оптична густина

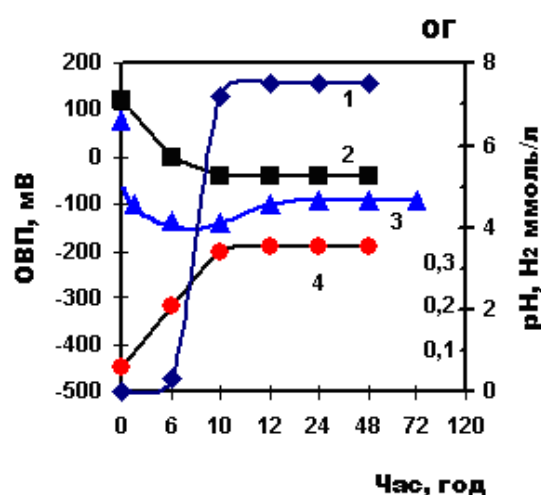


Рис.4. Динаміка росту *C.thermosaccharolyticum* 1S на середовищі з відновником: 1– Н₂; 2– рН; 3– ОВП; 4– оптична густина

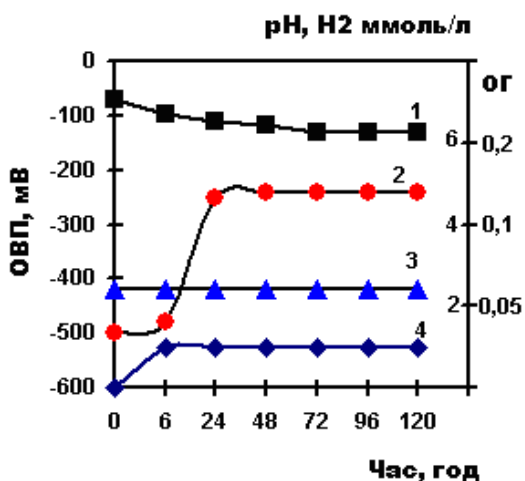


Рис. 5. Динаміка росту *C. thermocellum* 5СТ на середовищі з відновником цитратом титану (III): 1 – рН; 2 – оптична густина; 3 – ОВП; 4 –Н₂
(Аналогічні результати отримано при дослідженні росту сахаролітичного штаму 1S)

Пригнічення росту культури відбувається внаслідок окиснювання одного редокс-фактора, що регулює функціонування вирішального метаболічного процесу і може бути достатнім для зупинки росту. Дослідження впливу кисню на целюлазну активність (безклітинних екстрактів) *C.thermocellum* 5СТ показало, що целюлазна активність зберігається після кількох діб експозиції на повітрі.

Визначали залежність целюлазної активності *C.thermocellum* 5СТ від умов культивування та концентрації субстрату. Було зазначено, що при внесенні в середовище 1% целюлози спостерігається майже повний її гідроліз (80–100%). При концентрації целюлози – 2–3%, не утилізованими до кінця процесу залишаються 50–60% її кількості. Целюлолітична активність штаму підвищується при періодичних пересіваннях від`ємно-доливним методом при рН не нижче 6,5.

Було досліджено вплив метаболітів (водню, ацетату, етанолу), що утворюються при трансформації органічних речовин, на ріст анаеробних культур *C.thermocellum* 5СТ, *C.thermosaccharolyticum* 1S. Культивування проводили у культиваторі в атмосфері інертного газу – аргону. В експоненційній фазі росту культур у газову фазу культиватора було введено: водень у концентрації 30–100%, ацетат натрію 0,1–50%, етанол 0,1–3,0%. Встановлено, що із зростанням

концентрації водню відбувається збільшення лаг-фази росту культур, підвищення утворення етанолу і зниження кількості ацетату як для штаму 5СТ, так і 1S. При цьому, на утворення біомаси мікроорганізмів водень впливає по-різному: пригнічує ріст штаму 1S удвічі та не впливає на ріст штаму 5СТ.

Внесення ацетату натрію у концентрації 0,1–0,5% не пригнічувало процесу гідролізу целюлози штамом 5СТ і утворення водню. Збільшення концентрації ацетату натрію в 10 разів спричиняє зниження гідролізу целюлози в 1,5 раза. Внесення ацетату в середовище культивування штаму 1S в концентраціях 0,1–50% не пригнічувало утворення біомаси.

Внесення екзогенного етанолу у концентрації 0,5–2,0% збільшувало лаг-фазу росту культур, концентрація вища за 2,0% призводила до пригнічення росту.

Отже, розвиток та накопичення метаболітів *C.thermocellum* 5СТ і *C.thermosaccharolyticum* 1S спостерігається за значення ОВП –260 мВ та –140 мВ відповідно.

Визначено, що внесення екзогенного водню під час росту *C. thermocellum* 5СТ і *C.thermosaccharolyticum* 1S супроводжується підвищенням продукції етанолу вдвічі і зниженням утворення ацетату втричі.

Штами *C. thermocellum* 5СТ та *C.thermosaccharolyticum* 1S резистентні щодо етанолу у концентрації 2%. *C. thermocellum* 5СТ містить активний комплекс целюлазних ферментів, який є стійким щодо дії кисню.

БИОТРАНСФОРМАЦІЯ СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКОЇ СИРОВИНИ І ЕКОНОМІЧНА ЕФЕКТИВНІСТЬ ВПРОВАДЖЕННЯ ТЕРМОФІЛЬНИХ АНАЕРОБНИХ МІКРООРГАНІЗМІВ У ПРОМИСЛОВИХ УМОВАХ

На основі виділених монокультур було створено активні асоціації анаеробних мікроорганізмів, які містили: целюлолітичний штам *C.thermocellum* 5СТ, сахаролітичний штам *C.thermosaccharolyticum* 1S, метаногени *Methanobacterium* sp.13M і *Methanocarcina* sp.84MS.

При складанні асоціацій спрямовано увагу на фізіологічний стан кожного штаму та співвідношення між кількістю клітин різних культур, внесених у культиватор. Це необхідно для досягнення рівноваги в процесі конверсії основного джерела сировини, використаного для метаногенезу. Створені асоціації дали можливість підвищити вихід етанолу в 1,5 раза, водню в 2,0 рази (культивування штамів 5 СТ й 1S) та підвищити ефективність утворення метану – при спільному культивуванні усіх чотирьох культур при трансформації сільськогосподарської сировини.

Було проведено дослідження з оптимізації процесу переробки сільськогосподарської сировини. Як субстрати використовували курячий послід, гній свинячий, солому, торф. Культивування проводили з термофільною метаногенною асоціацією мікроорганізмів, що складалася з *C. thermocellum* 5СТ, *C. thermosaccharolyticum* 1S, *Methanobacterium* sp.13M, *Methanosarcina* sp.84 MS.

Зазначено, що отримання метану з використанням сільськогосподарської сировини відбувалося за 6–7 діб. Трансформація торфу, соломи відбувалася з низькою швидкістю газоутворення (1,8–4,6 ммоль/л), інтенсивніше (11,5–13,0 ммоль/л) – курячого посліду, гною свинячого (табл. 2).

Утворення метану термофільною анаеробною асоціацією за використання різної сільськогосподарської сировини

Субстрат	Концентрація CH ₄ ммоль/л середовища						
	1 доба	2 доба	3 доба	4 доба	5 доба	6 доба	7 доба
Курячий послід	2,0±0,01	3,0±0,01	6,4±0,01	12,3±0,01	13,0±0,01	13,3±0,01	14,0±0,01
Гній свинячий	1,0±0,02	1,5±0,01	4,4±0,02	10,8±0,02	11,5±0,01	12,5±0,01	12,0±0,01
Торф	0,2±0,03	0,3±0,01	1,0±0,01	1,3±0,01	1,8±0,02	1,8±0,01	1,8±0,02
Солома	0,4±0,01	1,3±0,01	2,3±0,01	3,8±0,02	4,5±0,01	4,6±0,01	4,6±0,01
Контроль-целюлоза	1,6±0,01	2,5±0,02	10,8±0,01	11,0±0,01	15,4±0,02	15,7±0,02	15,7±0,01

Дослідження проводили з курячим послідом у нативному і висушеному стані. Було визначено оптимальні, лімітуючі та пригнічуючі концентрації посліду при трансформації його в біопаливо анаеробною асоціацією. Показано, що оптимальною концентрацією для культивування метаногенної асоціації за використання нативного посліду є 10,0–12,0% та 1,0–1,5% сухого посліду, при цьому утворювалося до 1,33 л/л і 0,83 л/л метану на добу при оптимальному рН 7,0–7,3 та оптимальній температурі 55–60°C.

Концентрації нативного посліду нижче 10%, а сухого 1–1,5 % призводили до лімітування метанутворення. Концентрації субстрату нативного посліду понад 12% і сухого понад 2% призводили до пригнічення процесу метанутворення. Концентрації нативного посліду понад 20% та 3% для сухого посліду повністю пригнічують метанутворення.

На підставі експериментальних результатів за допомогою математичного моделювання досліджено динаміку функціонування метаногенної асоціації на популяційному рівні в умовах ліміту за субстратом метаногенної культури.

Проведені дослідження з використанням магнітів для інтенсифікації процесу трансформації органічних речовин у біопаливо. Доведено, що оброблення органічного субстрату (мелясної барди) в магнітному полі з частотою пульсації 2–10 Гц, магнітною індукцією 40–120 мТл (мілітеслів) при культивуванні анаеробної асоціації мікроорганізмів дало змогу інтенсифікувати вихід біогазу у 2 рази, етанолу і ацетату у 1,5 рази при швидкості потоку рідини 36 м/хв, порівняно з контрольним варіантом, який не обробляли в магнітному полі.

Оскільки курячий послід містить у своєму складі: целюлозу, геміцелюлозу, білки, комплекс мікро- і макроелементів, було досліджено його використання в якості поживного середовища для культивування мікроорганізмів різних груп. Встановлено, що ріст анаеробних мікроорганізмів (*C. thermocellum* 5СТ та метаногенної асоціації), умовно-патогених та сапрофітних мікроорганізмів (*E.coli*, *B.subtilis*, *C.tropicalis*) на середовищі на основі курячого посліду в 1,5–2 рази інтенсивніше ніж на середовищі «Р» та МПБ відповідно.

Проведені дослідження з економічної ефективності використання анаеробних асоціацій мікроорганізмів при переробці сільськогосподарської сировини. Анаеробну термофільну метаногенну асоціацію мікроорганізмів було впроваджено у підсобному господарстві НВО ім. М.В.Фрунзе м.Суми, при роботі промислової біогазової установки "Біогаз 30ІС". Загальний економічний ефект від впровадження

технології зброджування стічних вод свиногомплесу становив 769 417,8 грн/рік. Впровадження технології з використанням іммобілізованих клітин мікроорганізмів поліпшило роботу установки з інактивації в стічних водах патогенних мікроорганізмів, дало можливість відмовитися від будівництва додаткових очисних споруд та збільшити вихід біогазу з 1м³ стічних вод в 1,3 рази (455 м³ /на добу).

Розроблені методики і пристрої для виділення, культивування та вивчення фізіолого-біохімічних властивостей анаеробних мікроорганізмів впроваджено у міжрегіональному інституті альтернативних технологій «Альтек».

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі викладено науково-методичні засади використання анаеробних термофільних (целюлолітичних, сахаролітичних та метанутворюючих) мікроорганізмів для біотрансформації сільськогосподарської сировини в біопаливо при вдосконаленні методів і засобів анаеробного культивування, виділенні накопичувальних і чистих культур облігатних анаеробних мікроорганізмів з різних екосистем та встановленні факторів, що впливають на процес анаеробної біотрансформації.

1. Розроблено і модифіковано пристрої та методи анаеробного культивування мікроорганізмів (культиватор для визначення параметрів росту анаеробів, зонд-фіксатор для видалення кисню з культиваторів, пристрій для «холодної стерилізації» термолабільних речовин, анаеростат), які дали змогу проводити фундаментальні дослідження з виділення та культивування анаеробних мікроорганізмів при трансформації органічних відходів.
2. З різних екосистем (солоні та прісні водойми, сільськогосподарські, побутові відходи) виділено накопичувальні культури анаеробних мікроорганізмів, що трансформують С₁ – С₂ органічні сполуки, целюлозу, гній, послід у біопаливо.
3. Вперше виділено та ідентифіковано нові штами облігатних анаеробних термофільних мікроорганізмів: целюлолітичний *Clostridium thermocellum* 5CT, сахаролітичний *C. thermosaccharolyticum* 1S, метанутворюючі *Methanobacterium* sp.13M та *Methanosarcina* sp. 84MS, які утилізують сільськогосподарську та іншу сировину.
4. Встановлено, що розвиток та накопичення метаболітів *C.thermocellum* 5CT і *C.thermosaccharolyticum* 1S спостерігаються за значення окисно-відновного потенціалу –260 мВ і –140 мВ відповідно.
5. Визначено, що внесення екзогенного водню під час росту культур *C.thermocellum* 5CT і *C.thermosaccharolyticum* 1S супроводжується підвищенням продукування етанолу вдвічі і зниженням утворення ацетату втричі. Штами резистентні щодо етанолу у концентрації 2%.
6. Штам *C. thermocellum* 5CT продукує активний комплекс целюлазних ферментів, який є стійким до дії кисню.
7. На основі виділених монокультур бактерій створено асоціації анаеробних мікроорганізмів та встановлено оптимальне співвідношення монокультур, яке дає змогу впливати на вихід кінцевих продуктів метаболізму – метану, етанолу, ацетату при трансформації сільськогосподарської сировини.
8. Встановлено, що за рН 7,0–7,3 і температури 55–60°C досягається максимальна трансформація курячого посліду у біопаливо за використання – 10,0–12,0% нативного та 1,0–1,5% сухого посліду.

РЕКОМЕНДАЦІЇ І ВПРОВАДЖЕННЯ У ВИРОБНИЦТВО

1. Розроблено та рекомендовано спосіб інтенсифікації трансформації органічних відходів сільськогосподарського та інших виробництв обробкою в полі магнітів з частотою пульсації 2–10 Гц, магнітною індукцією 40–120 мТл за швидкості потоку рідини 36 м/хв.
2. Науково-технічну розробку «Використання іммобілізованих клітин анаеробних мікроорганізмів» впроваджено у НВО ім. М.В.Фрунзе м. Суми (економічний ефект становить 769 417,8 грн/рік.).
3. Розроблені методики і пристрої для виділення, культивування та вивчення фізіолого-біохімічних властивостей облигатних анаеробних мікроорганізмів впроваджено у міжрегіональному інституті альтернативних технологій «Альтек».

СПИСОК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ:

1. Ястремская Л. С. Идентификация термофильных анаэробных микроорганизмов, изолированных из метантенка /Л.С. Ястремская //Микроб. журн. – 1993. – Т.55, в.6.– С.3–12. (Особистий внесок – планування, проведення досліджень, аналіз експериментальних даних, підготовка матеріалів статті до друку.)
2. Ястремська Л.С. Анаеробна конверсія сільськогосподарських відходів у біопаливо / Л.С. Ястремська //збірн. наук. праць УДАУ «Основи формування продуктивності сільськогосподарських культур за інтенсивних технологій вирощування». – Умань. – 2008. – С.337–343. (Особистий внесок –планування та проведення досліджень, аналіз даних, підготовка матеріалів статті до друку.)
3. Ястремская Л. С. Стерилизация фильтрованием в анаэробных условиях / Л. С. Ястремская, Д. В. Чернышенко, В. И. Карпенко // Микроб. журн. –1992. – Т.54, в.4.– С.82–84.(Особистий внесок – розробка ідеї, креслення, підготовка до друку).
4. Ястремская Л. С. Стеклоанный анаэроустат для культивирования анаэробных микроорганизмов на плотных средах /Л. С. Ястремская, Д. В. Чернышенко, В.И. Карпенко //Микроб. журн. – 1992. – Т.54, в.4. – С.84–88. (Особистий внесок – розробка ідеї, креслення, підготовка до друку).
5. Романовская В.А. Трансформация растительного сырья анаэробными микроорганизмами /В.А. Романовская, Л.С. Ястремская, Ю.Р. Малашенко, В.И. Карпенко, М.Л. Пикерский // Микроб. журн. – 1986. –Т.48, №4. – С.27–33. (Особистий внесок–постановка експериментів, проведення статистичної обробки результатів, підготовка матеріалів статті до друку).
6. Карпенко В.І. Закономірності трансформації полімерних сполук у метан термофільними анаеробними бактеріями /В.І. Карпенко, Л.С. Ястремська, Л.П. Голодок, І.Г. Бурун, Я.В. Лембей, О.С. Татарченко // Вісн. Дніпропетров. ун-ту. Сер. Біологія. Екологія. – 2006. – Т.2, в.14. – № 3. – С.79–84. (Особистий внесок – планування, проведення досліджень, аналіз експериментальних даних, підготовка матеріалів статті до друку.)
7. Карпенко В.І. Взаємодія мікробних популяцій у метаногенних асоціаціях і шляхи збільшення виходу метану в метантенках /В.І. Карпенко, Л.С. Ястремська, Л.П. Голодок, І.Г. Бурун, Я.В. Лембей, О.С. Голубов // Вісн. Дніпропетров. уні-ту. Сер. Біологія. Екологія. – 2006. – Т.1, в.14. – № 3/1. – С.80–85. . (Особистий внесок – планування, проведення досліджень, аналіз експериментальних даних, підготовка матеріалів статті до друку.)

8. Чернышенко Д.В. Система фиксируемого газового зонда для удаления кислорода из анаэробных культиваторов и пробирок / Д.В. Чернышенко, Л.С. Ястремская, В.И. Карпенко // Микроб. журн. – 1991. – Т.53, в.3. – С.100–102. (Особистий внесок – розробка ідеї, креслення, підготовка статті до друку).
9. Чернышенко Д.В. Культиватор для изучения ростовых процессов анаэробных микроорганизмов / Д. В. Чернышенко, Я. Н. Данько, А. Б. Таширев, О. С. Радченко, Л. С. Ястремская // Микроб. журн. – 1990. – Т.52, в.6. – С.90–92. (Особистий внесок – виконання креслення, підготовка статті до друку).
10. Патент на к. м. 30111 Україна, МПК (2006), СО 2F 3/00. Спосіб інтенсифікації росту та отримання метаболітів з органічних речовин аеробно-анаэробними мікроорганізмами при магнітній обробці / Карпенко В. І., Кисла Л. В., Геращенко В. О., Ястремська Л. С., Фелелов О. О. – № 30111; заявл. 30.10.07; опубл. 11.02.08, Бюл. № 3. (Особистий внесок – проведення експериментальних досліджень, підготовка матеріалів до оформлення патенту).
11. Карпенко В.И. Синтез белка микроорганизмов на сточных водах птицефабрики / В.И. Карпенко, Л.С. Ястремская, В.О. Мыслович: матер. конф. [Проблемы и перспективы биотехнологии], (Братислава, 23–27 янв. 1989 г). – 1989. – С.101.
12. Малащенко Ю.Р. Анаэробная конверсия свиного навоза в биогаз и органоминеральные удобрения / Ю.Р. Малащенко, И.В. Семенов, С.И. Якушко, Ф.В. Мучник, Л.С. Ястремская, В.И. Карпенко: мат. VII съезда Укр. микр. общ-ва, (Черновцы, сент. 1989 г.) / АН УССР, [и др.]. – Киев-Черновцы: 1989. – ч.1. – С.120.
13. Романовская В. А. Изучение метанобразования на основе растительного (возобновляемого) сырья / В.А. Романовская, В.И. Карпенко, Т.А. Гринберг, Л.С. Ястремская: Тез. докл. симп. ["Биоконверсия растительного сырья"], (Рига, 12–16 апр. 1982г.) / Всесоюзн. Микроб. общ-во АН СССР. – Рига: 1982. – Т.2. – С.257.
14. Ястремська Л.С. Культивування целюлолітичного анаэробного термофільного штаму *Clostridium thermocellum* 5СТ на відходах птахівництва / Л.С. Ястремська, В.І. Карпенко: Мат. VI міжн. конф. [Безпека життя і діяльності людини – освіта, наука, практика], (Київ, 15–17 бер. 2007 р.) / М-во освіти і науки України, НАУ. – К.: Нац. авіа.ун-т, 2007. – С.248–249.
15. Ястремська Л.С. Вплив окисно-відновного потенціалу середовища на розвиток анаэробного термофільного целюлолітичного штаму *Clostridium thermocellum* 5СТ / Л.С. Ястремська, В.І. Карпенко, Л.П. Голодок : мат. міжн. конф. [Сучасні проблеми біології, екології та хімії] (Запоріжжя, 29–01 квіт. 2007р.) / М-во освіти і науки України [та ін.]. – Запоріжжя: ЗНУ, 2007. – С.497–498.
16. Ястремская Л.С. Двухфазная переработка животноводческих комплексов / Л.С. Ястремская, Е.О. Муращик, В.И. Карпенко: мат. конф. [Проблемы и перспективы биотехнологии], (Братислава, 23–27 янв. 1989 г). – 1989. – С.82–83.
17. Ястремская Л.С. Некоторые физиолого-биохимические свойства целлюлозо-разрушающих культур рода *Clostridium* / Л.С. Ястремская, Е.О. Муращик: мат. VII съезда Укр. микроб. общ-ва, (Черновцы, сент. 1989 г.) / АН УССР, [и др.]. – Киев-Черновцы: 1989. – ч.1. – С.134.
18. Ястремская Л.С. Микробиологическая переработка отходов животноводческих комплексов в анаэробных условиях / Л.С. Ястремская, Е.О. Муращик, В.И. Карпенко: Тез. докл. конф. [Микробиологические методы защиты окружающей среды], (Пушино, 5–7 апр. 1988 г.) / АН СССР, [и др.]. – Пушино : 1988. – С.127.

19. Karpenko V.I. Distribution of methanogenic associations in various niches / V.I. Karpenko, L.S. Yastremskaya, V.A. Romanovskaya, J.R. Malashenko: 10-th Congress of the Hungarian Society of microbiology (26–29 aug. 1987): Abstr. – Hungary. – 1987. – P.17.
20. Karpenko V.I. Isolation of enrichment microbial cultures converting brown coal to gaseous energy sources / V.I. Karpenko, L.S. Yastremskaya, D.V. Chernyshenko, V.A. Romanovskaya, J.R. Malashenko, N.K. Vasilchikov: Symposium on biotechnology fuels and chemical (8–12 may 1989): Abstr. – Colorado-Spring. – USA. – 1989. – P.122.
21. Malashenko Y.R. Medium redox-potential during cultivation of methanogenic community / J.R. Malashenko, D.V. Chernyshenko, Y.N. Danko, L.S. Yastremskaya, V.I. Karpenko: Symposium on biotechnology for fuel and chemicals (8–12 may 1989): Abstr. – Colorado-Spring. – USA. – 1989. – P.82.
22. Yastremskaya L.S. Some aspects of microbial conversion of cellulosic raw material in biogas / V.I. Karpenko, L.S. Yastremskaya: 10-th Congress of the Hungarian Society of microbiology (26–29 aug. 1987): Abstr. – Hungary. – 1987. – P.43.

АНОТАЦІЇ

Ястремська Л.С. Роль анаеробних мікроорганізмів у трансформації сільськогосподарської сировини в біопаливо. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата сільськогосподарських наук за спеціальністю 03.00.07 – мікробіологія. – Уманський державний аграрний університет, Умань, 2008.

Дисертацію присвячено вивченню анаеробних мікроорганізмів та їх ролі у трансформації сільськогосподарської сировини в біопаливо. Розроблено спеціальні пристрої для виділення, культивування та вивчення фізіолого-біохімічних властивостей облигатних анаеробних мікроорганізмів при трансформації органічних відходів. З активного мулу метантенка виділено та ідентифіковано нові штами облигатних анаеробних термофільних целюлолітичних, сахаролітичних та метаногенних мікроорганізмів – *C.thermocellum* 5CT, *C.thermosaccharolyticum* 1S, *Methanobacterium* sp.13M, *Methanosarcina* sp. 84 MS, які утилізують сільськогосподарську та іншу сировину.

Для *C.thermocellum* 5CT і *C.thermosaccharolyticum* 1S встановлено оптимальний рівень окисно-відновного потенціалу, що дорівнює –260 мВ та –140 мВ відповідно, який визначає інтенсивність процесів біосинтезу культур.

Досліджено вплив метаболітів, що утворюються при трансформації органічних речовин, на життєдіяльність анаеробних культур. Показано, що водень регулює розвиток і вихід кінцевих продуктів *C. thermocellum* 5CT і *C.thermosaccharolyticum* 1S. Підвищення концентрації водню призводить до збільшення кількості етанолу удвічі і зменшення утворення ацетату утричі.

Штами *C. thermocellum* 5CT і *C.thermosaccharolyticum* 1S резистентні до етанолу у концентрації 2%. *C. thermocellum* 5CT містить активний целюлазний комплекс ферментів, який є стійким щодо дії кисню.

На основі виділених монокультур складено асоціації анаеробних мікроорганізмів, які запропоновано використовувати в переробленні сільськогосподарської сировини. Знайдено оптимальне співвідношення

монокультур, яке дає змогу впливати на вихід кінцевих продуктів метаболізму – метану, етанолу, ацетату.

Для інтенсифікації виходу біопалива і одержання метаболітів при трансформації органічних відходів запропоновано використовувати магнітні поля з частотою пульсації 2–10 Гц, з магнітною індукцією 40–120 мТл за швидкості потоку рідини 36 м/хв.

Ключові слова: анаеробні мікроорганізми, метаногенез, целюлолітичні бактерії, метанутворюючі археї, сільськогосподарські відходи, метанове бродіння.

Ястремская Л.С. Роль анаэробных микроорганизмов при трансформации сельскохозяйственного сырья в биотопливо. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата сельскохозяйственных наук по специальности 03.00.07–микробиология. – Уманский государственный аграрный университет, Умань, 2008.

Диссертация посвящена изучению анаэробных микроорганизмов и их роли в трансформации сельскохозяйственного сырья в биотопливо. Разработаны специальные методики и устройства для выделения, культивирования и изучения физиолого-биохимических свойств облигатных анаэробных микроорганизмов при трансформации органических веществ. Из активного ила метантенка выделены и идентифицированы новые штаммы облигатных анаэробных термофильных целлюлолитических, сахаролитических и метаногенных микроорганизмов – *C.thermocellum* 5CT, *C.thermosaccharolyticum* 1S, *Methanobacterium* sp.13M, *Methanosarcina* sp. 84 MS, которые утилизируют сложные органические вещества.

Для целлюлолитического штамма *C.thermocellum* 5CT и сахаролитического штамма *C.thermosaccharolyticum* 1S установлен оптимальный уровень окислительно-восстановительного потенциала, который равен –260 мВ и –140 мВ соответственно, который определяет интенсивность процессов биосинтеза культур.

Исследовано влияние метаболитов, которые образуются при трансформации органических веществ на жизнедеятельность анаэробных культур. Показано, что водород как основной метаболит регулирует развитие культур и выход конечных продуктов *C. thermocellum* 5CT и *C.thermosaccharolyticum* 1S. Увеличение концентрации водовода сопровождается повышением образования этанола в 2 раза и снижением образования ацетата в 3 раза.

Штаммы *C. thermocellum* 5CT и *C.thermosaccharolyticum* 1S резистентны к 2% этанола. *C.thermocellum* 5CT содержит активный целлюлазный комплекс ферментов, который устойчив к действию кислорода. Определена зависимость целлюлазной активности *C.thermocellum* 5CT от условий культивирования и концентрации субстрата.

На основе выделенных монокультур составлены ассоциации анаэробных микроорганизмов, которые предложено использовать в разных биотехнологиях, в частности, в переработке сельскохозяйственного сырья. Найдено оптимальное соотношение монокультур, которое дает возможность влиять на выход конечных продуктов метаболизма – метана, этанола, ацетата.

Установлено, что при рН 7,0–7,3 и температуре 55–60°C, максимальная трансформация куриного помета в биотопливо достигается при использовании в качестве субстрата – 10,0–12,0% нативного и 1,0–1,5% сухого помета.

Для интенсификации выхода биогаза и получения метаболитов при трансформации органических отходов предложено использовать магнитные поля с частотой пульсации 2–10 Гц и с магнитной индукцией 40–120 мТл при скорости потока жидкости 36 м/хв.

Ключевые слова: анаэробные микроорганизмы, метаногенез, целлюлолитические бактерии, метанобразующие археи, сельскохозяйственные отходы, метановое брожение.

Yastremskaya L. Role of anaerobic microorganisms during transformation of agricultural raw material in a biogas. – Manuscript.

Dissertation for scientific degree of candidate of agricultural sciences on specialty 03.00.07 – microbiology. – Uman state agrarian university, Uman, 2008.

Dissertation is devoted to the study of anaerobic microorganisms and their role in transformation of agricultural raw material in a biogas. The special methods and study of devices for a selection, cultivation and study of physiological biochemical properties of anaerobic microorganisms were developed. From the thermophilic accumulating methanogenes culture from active silt of methantank were isolated and identified thermophilic cellulolytic, saccharolytic and methanogenes microorganisms – *C.thermocellum* 5CT, *C.thermosaccharolyticum* 1S, *Methanobacterium* sp.13M, *Methanosarcina* sp. 84 MS, which will utilize organic matters. For cellulolytic strain of *C.thermocellum* 5CT and saccharolytic strain of *C.thermosaccharolyticum* 1S was found an level of an optimum redox-potential, which is equal –260 mV and –140 mV, accordingly, which determines intensity of processes of biosynthesis of cultures.

Influencing products of metabolism is explored, which appear during transformation of organic matters on the vital functions of anaerobic cultures. It is shown, that hydrogen as product of metabolism is regulated by development of cultures and output of the finished products of metabolism of *C. thermocellum* 5CT and *C. thermosaccharolyticum* 1S. Multiplying the concentration of hydrogen to intensification of formation of ethanol in 2 times and formation of acetate oppresses in 3 times.

Strains of *C. thermocellum* 5CT and *C.thermosaccharolyticum* 1S resistant to 2% ethanol. Strain of *C. thermocellum* 5CT contains the active cellulase complex of enzymes, steady to the action of oxygen.

Based on the selected monocultures was composed association of anaerobic microorganisms, which was suggested to use in different biotechnology, for example, in processing of wastes of agricultural productions.

Optimum correlation of monocultures, which are included in an association, was found, which enable to make influence on the output of the finished goods of metabolism – methane, ethanol, acetate.

For intensification of output of a biogas and of metabolites during transformation of organic wastes. It was suggested to use the magnetic fields with frequency of pulsation 2–10 Hz and with magnetic induction of 40–120 mTl, at speed of stream of liquid of 36 m/m.

Keywords: anaerobes microorganisms, cellulolytic bacteria, methanogenes, methanogenes archaea, agricultural wastes, and methane fermentation.