

## **ВИКОРИСТАННЯ АНАЕРОБНИХ МІКРООРГАНІЗМІВ ПРИ БІОКОНВЕРСІЇ ВІДХОДІВ ЦЕЛЮЛОЗО-ПАПЕРОВОЇ ПРОМИСЛОВОСТІ**

**К.М. ЯБЛОНСЬКА, Л.С. ЯСТРЕМСЬКА, В.В. ХРОБУСТ**

Національний авіаційний університет, м. Київ

*Виділено нову анаеробну термофільну асоціацію мікроорганізмів, яка здатна ефективно очищати стічні води Київського картонно-паперового комбінату з одночасним отриманням біопалива, кислот, спиртів та збродженої маси.*

***Ключові слова:** анаеробні мікроорганізми, біопаливо, стічні води, сульфатредукція, метаногенез, хімічне споживання кисню, целюлозовмісні відходи.*

**Вступ.** Сьогодні центри целюлозного виробництва розташовані на великих річках, тому такі підприємства є одними з основних забруднювачів водних об'єктів. На целюлозо-паперових заводах утворюється велика кількість стічних вод, що містять волокна целюлози та лігнін, з утилізацією яких багато підприємств мають серйозні проблеми.

Целюлозовмісні відходи вважаються перспективними видами сировинних ресурсів для їх трансформації в анаеробних умовах у джерела енергії (водень, етанол, метан), органічні кислоти (оцтова кислота, пропіонат, бутират), ферменти (целюлази, геміцелюлази), білково-вітамінні речовини тощо [2].

Традиційна технологія очищення таких відходів в аеротенках економічно не ефективна [5]. У зв'язку з цим актуальним є дослідження анаеробної біоконверсії целюлозовмісних відходів. Тому метою роботи є виділення анаеробних метаногенних асоціацій мікроорганізмів із стічних вод целюлозо-

паперової промисловості, селекціонування активних форм вказаних мікроорганізмів та використання селекціонованої асоціації мікроорганізмів для очистки стічних вод Київського картонно-паперового комбінату.

**Матеріали і методи досліджень.** Проби стічних вод відбирали на Київському картонно-паперовому комбінаті. Культивування проводили в строго анаеробних умовах на елективному середовищі «Р» наступного складу (на 1 л дистильованої води):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0,4 мг;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  – 1,0 мг;  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  – 1,0 мг;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – 0,02 мг;  $\text{NaHCO}_3$  – 1,0 мг; 0,2 % індикатор резазурін – 1 мл; рН середовища 7,0-7,3 [7]. Окремо вносили і готували розчин відновника для створення відновних умов у середовищі: сульфід натрію (10%  $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  – 20 мл/л). В якості вуглеводневого субстрату застосовували целюлозу – смужки фільтрувального паперу (1 об/%) [2, 6]. Середовище розливали у флакони об'ємом 250 мл, закривали пробками з бутилової гуми з різьбовими металевими ковпачками та стерилізували при 1,5 атм [6]. У стерильне середовище шприцем вносили інокулят (10 мл). Посіви інкубували впродовж 7–14 діб при температурі 35, 40, 60 та 80 °С.

Ріст культури визначали за наступними ознаками:

- за ступенем руйнування целюлози у флаконах – візуально;
- за виділенням газів  $\text{H}_2$ ,  $\text{CO}_2$  та  $\text{CH}_4$  – газовою хроматографією;
- за утворенням ацетату, етанолу, бутирату, пропіонату та лактату – газорідною хроматографією.

Морфологію клітин вивчали на мікроскопі «Микмед-1» ( $\times 1500$ ). Фарбували клітини за Грамом в модифікації Сінєва згідно з загальноприйнятими методами [4]. Склад газів аналізували на газовому хроматографі ЛХМ-8МД, визначення жирних кислот і спиртів – на хроматографі "Chrom-5". Об'єм проб – 5-10 мкл.

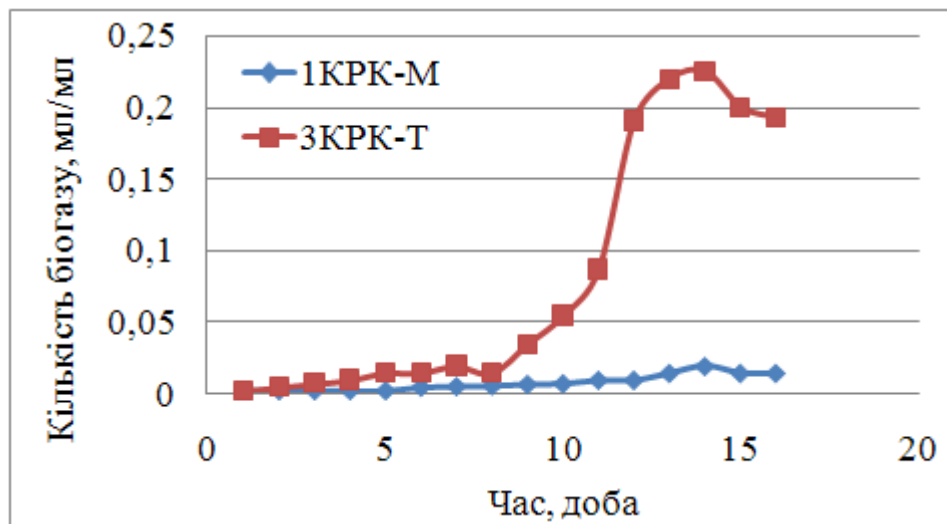
Визначення хімічного споживання кисню (ХСК) проводили за загальноприйнятими методиками [3].

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

**Результати дослідження та їх обговорення.** Із зразків стічних вод Київського картонно-паперового комбінату було виділено мезофільну (35 °С) *1КПК-М* та термофільну (60 °С) *3КПК-Т* накопичувальні анаеробні культури, які руйнували целюлозу та продукували біогаз впродовж різного періоду часу.

Мезофільна накопичувальна культура *1КПК-М* виявилася не досить активною. Лише на 14 добу культивування починалось продукування біогазу (0,02 мл/мл) та незначне руйнування целюлози (рис.1).

Термофільна накопичувальна культура *3КПК-Т* виявилася в 10 разів активнішою за мезофільну *1КПК-М*. Початок продукування біогазу спостерігався вже на 2–3 добу культивування, на 7 добу повністю розкладалась целюлоза, що дало змогу отримати до 0,2 мл/мл біогазу (рис. 1).

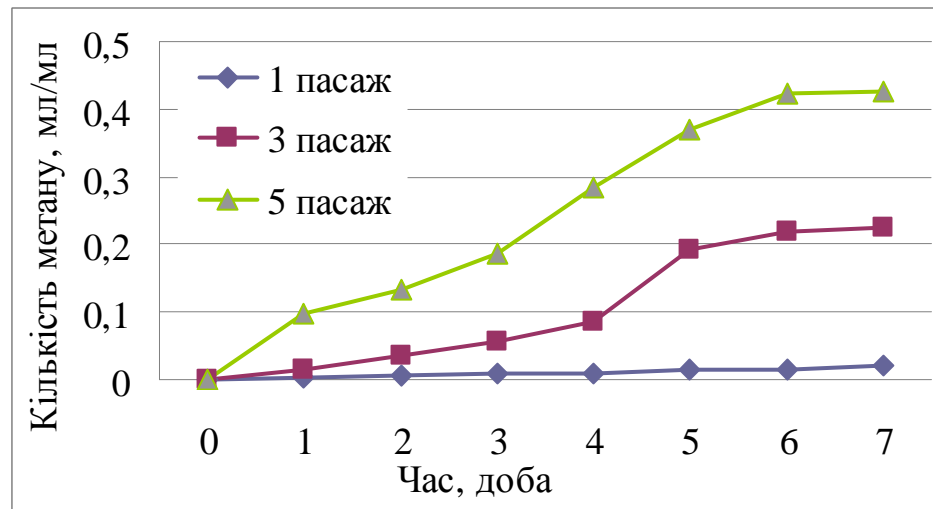


**Рис. 1. Динаміка газоутворення виділених накопичувальних анаеробних мезофільних (*1КПК-М*) та термофільних (*3КПК-Т*) культур в залежності від часу культивування**

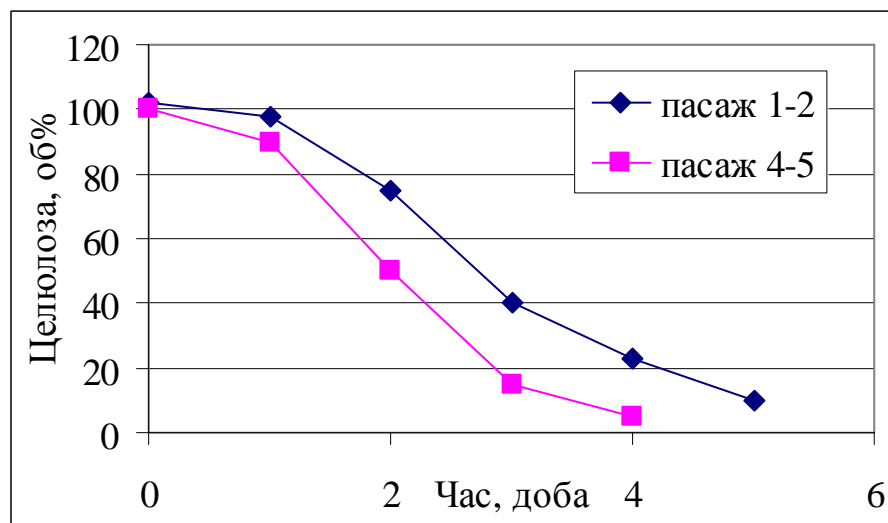
Оскільки термофільна культура проявляла більшу активність, то подальші роботи проводилися лише з нею.

Було проведено селекціонування культури *3КПК-Т* при періодичних пересіваннях від'ємно-доливним способом за рН не нижче 6,5. Показано, що з кожним пересівом активність газоутворення (рис. 2) та розкладання целюлози збільшувалася (рис. 3) та скорочувався час культивування – на 2-3 доби. При першому посіві кількість виділеного метану складала 0,05 мл/мл, при п'ятому –

0,425 мл/мл. Після кожного пересіву проводили газову та газорідинну хроматографію, а також якісні реакції на присутність сірководню.



**Рис. 2. Утворення метану термофільною анаеробною асоціацією мікроорганізмів ЗКРК-Т в залежності від пересівання**



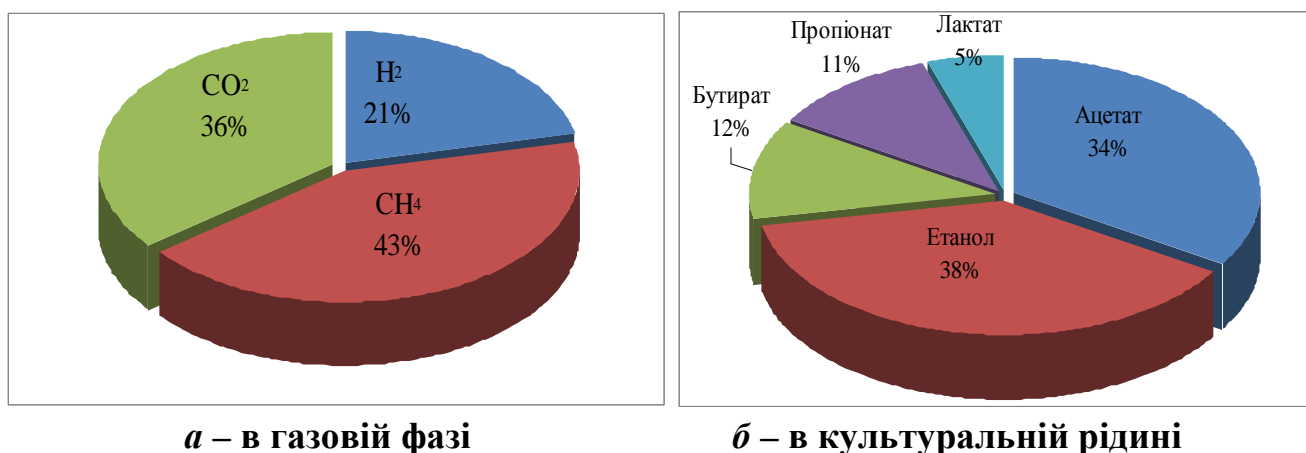
**Рис. 3. Розкладання целюлози термофільною анаеробною асоціацією мікроорганізмів ЗКРК-Т в залежності від пересівання**

Після першого пересівання відмічалася невелика кількість утвореного метану (лише 0,05 мл/мл) та виявлено присутність сірководню. Це можливо пояснити присутністю сульфатредукторів на початкових етапах виділення культури. Очевидно, що затримання продукування метану обумовлено конкуренцією між сульфатвідновлювальними бактеріями та метаногенами за донори електронів – водень. Наявність сульфатредукторів або метаногенів

обумовлює кінцеву стадію відновлення  $\text{CO}_2$  воднем до метану або сульфату до сірководню. Оскільки в поживному середовищі, яке слугувало для анаеробного культивування асоціації мікроорганізмів *ЗКРК-Т* джерела сульфату були виключені, тому з подальшими пересіваннями кількість утвореного метану збільшувалась (до 0,5 мл/мл).

Сульфатвідновлювальні бактерії відіграють важливу роль в очищенні стічних вод від сполук сірки та сульфатів, а утворений ними гідроген сульфід ( $\text{H}_2\text{S}$ ) здатний осаджувати важкі метали (кобальт, нікель, кадмій, залізо, свинець, цинк, ртуть та інші метали), чим сприяє очищенню водою від цих ксенобіотиків [1].

Аналіз продуктів метаболізму анаеробної термофільної асоціації мікроорганізмів *ЗКРК-Т* показав, що у газовій фазі присутні водень, вуглекислий газ та метан, а в культуральній рідині – етанол, ацетат, бутират, пропіонат, лактат у різному відсотковому співвідношенні (рис. 4).

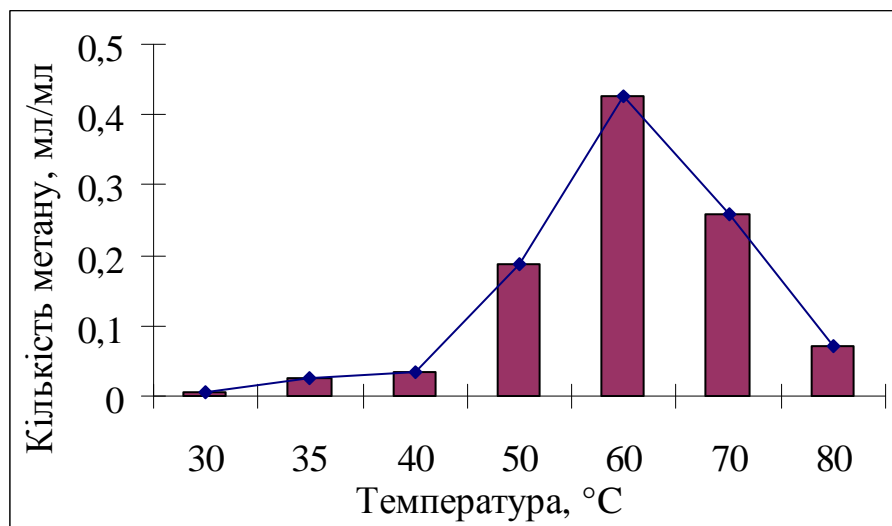


**Рис. 4. Продукти метаболізму термофільної асоціації мікроорганізмів *ЗКРК-Т* на 7 добу культивування**

Під час біотрансформації органічної речовини виділеною анаеробною термофільною асоціацією мікроорганізмів *ЗКРК-Т* важливим було підібрати оптимальні умови культивування, а саме температурні режими та значення  $p\text{H}$  середовища.

Було встановлено, що виділена асоціація мікроорганізмів *ЗКРК-Т* здатна рости на целюлозі з утворенням біопалива в межах температур від 55 до 70 °С.

Оптимальна  $t = 60$  °С. Підвищення та зменшення вказаної температури призводило до зниження швидкості росту клітин виділеної асоціації мікроорганізмів, в процесі чого зменшувалась інтенсивність розкладання целюлози та виділення метану (рис. 5).

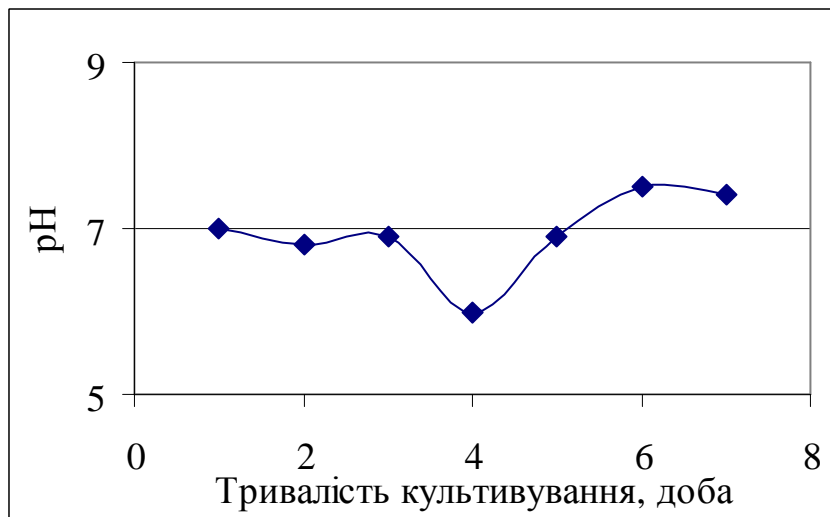


**Рис. 5. Інтенсивність утворення метану асоціацією мікроорганізмів *ЗКРК-Т* на 7 добу культивування за різних температур**

З рис. 5 видно, що при температурі 60 °С спостерігається максимальне виділення метану (0,425 мл/мл), а при 40 та 80 °С – відмічається незначна його кількість (0,0055 мл/мл та 0,012 мл/мл відповідно).

Важливе значення також має  $pH$  середовища культивування. Було встановлено, що в процесі анаеробного перетворення целюлози з утворенням метану виділеною термофільною асоціацією мікроорганізмів *ЗКРК-Т*  $pH$  середовища спочатку знижується з 7,0 до 6,0. Це обумовлено утворенням ацетату та етанолу. На стадії метаноутворення відбувалося підвищення  $pH$  до 7,5 (рис. 6).

Визначено, що максимальне розкладання целюлози та виділення метану анаеробною асоціацією мікроорганізмів *ЗКРК-Т* відбувається за температури – 60 °С та  $pH$  – 7,0–7,5.



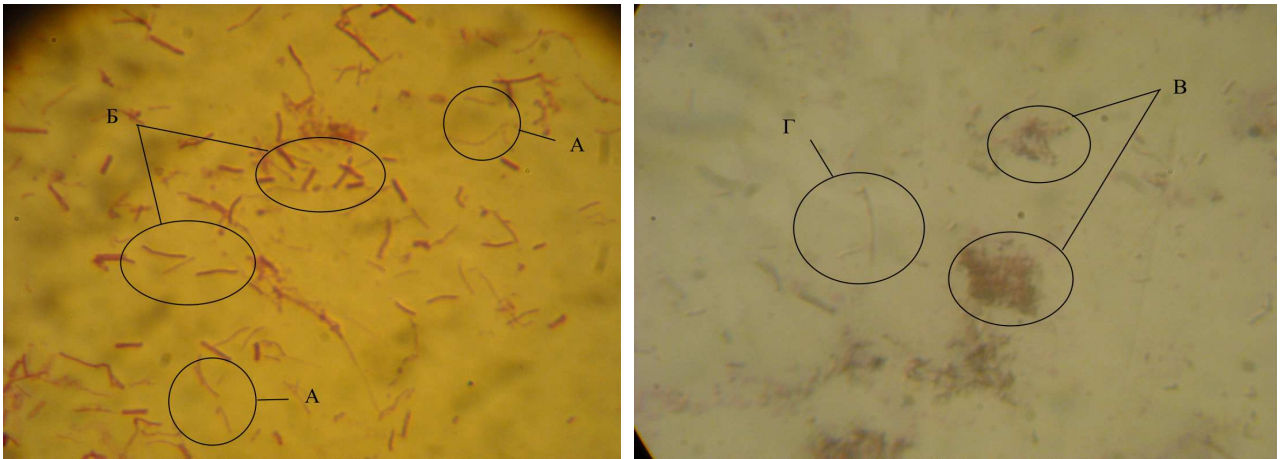
**Рис. 6. Зміна рН середовища при розкладанні целюлози до метану анаеробною асоціацією мікроорганізмів *ЗПКК-Т***

Проведені дослідження морфологічних ознак отриманої селекціонованої асоціації мікроорганізмів *ЗПКК-Т* показали, що до її складу входять паличкоподібні та кокоподібні типи клітин (рис. 7):

1. Тонкі палички із закругленими кінцями, розмір яких складає 0,6–0,8×3,0–5,0 мкм. Поодинокі, парні або у ланцюгах до 10 мкм, грамнегативні (рис. 7, А, Г). На середовищі з целюлозою утворюють термінальні, круглі спори та продукують етанол, ацетат, водень, CO<sub>2</sub>.

2. Рухомі палички розміром 0,2–2,0×1,5–3,0 мкм, поодинокі, парні або утворюють довгі ланцюги, грамнегативні (рис. 7, Б). Використовують цукри. Утворюють термінальні спори та основними продуктами ферментації є водень, вуглекислий газ, ацетат, етанол, бутират, лактат, пропіонат.

3. Кокоподібні, діаметром 1–2 мкм, які розмножуються поділом у різних напрямках і поєднуються по 2, 4, 8 у сарциноподібні нерухомі пакети (рис. 7, В), для метанутворення використовують субстрати – метанол, ацетат, метиламіни.

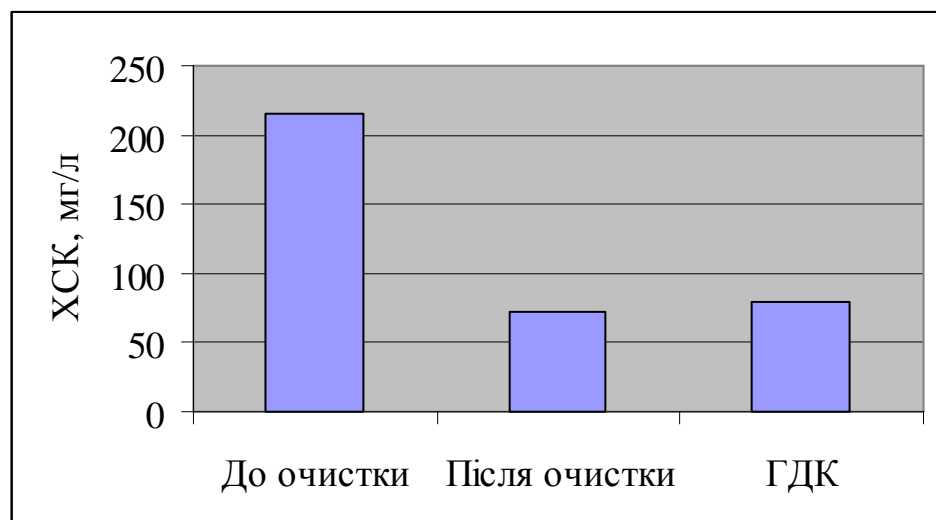


**Рис. 7. Світлова мікроскопія виділеної анаеробної термофільної асоціації мікроорганізмів ЗКРК-Т (збільшення  $\times 1500$ ), фарбування за Грамом:**

**А – целюлозолітичні, Б – бродильні, В – метаногенні.**

Перший та другий тип клітин може належити до целюлозоруйнуючих мікроорганізмів роду *Clostridium*, третій – до метаногенних роду *Methanosarcina*.

В лабораторних умовах було проведено дослідження процесу очистки стічних вод Київського картонно-паперового комбінату виділеною селекціонованою асоціацією мікроорганізмів ЗКРК-Т. Показано, що значення ХСК на 7 добу культивування після анаеробного зброджування знижувалося майже в 3 рази, що дало можливість отримати очищену воду зі значенням ХСК 72 мг/л. Останнє відповідає встановленим значенням ГДК (рис. 8).



**Рис. 8. Значення ХСК стічних вод Київського картонно-паперового комбінату до та після очистки**



У збродженій масі після очистки стічних вод Київського картонно-паперового комбінату можуть міститися солі важких металів [5], тому вона не може бути використана в якості добрива в агросекторі навіть після ферментації в біореакторі. З метою уникнення накопичення шкідливих мулових майданчиків доцільно використовувати отриману масу (шлак) в дорожному та іншому будівництві.

## ВИСНОВКИ

Виділено активну анаеробну метаногенну термофільну асоціацію мікроорганізмів *ЗКРК-Т* із стічних вод Київського картонно-паперового комбінату, яка складається із целюлозоруйнуючих та метаногенних культур.

Селекціонування метаногенної асоціації мікроорганізмів *ЗКРК-Т* періодичними пересіваннями від'ємно-доливним способом дозволило в 10 разів підвищити активність газоутворення та скоротити час розкладання целюлози на 2-3 доби з одночасним утворенням  $\text{CH}_4$ , етанолу, пропіонату, бутирату та лактату.

Лабораторними дослідженнями встановлено, що очистка стічних вод Київського картонно-паперового комбінату селекціонованою анаеробною асоціацією мікроорганізмів *ЗКРК-Т* дозволяє зменшити рівень ХСК стічних вод у 3 рази.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Буракаева А. Д. Роль микроорганизмов в очистке сточных вод от тяжелых металлов: метод. пособие / А. Д. Буракаева, А. М. Русанов, В. П. Лантух. – Оренбург : ОГУ, 1999. – 51 с.
2. 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.

3. Метод определения химического потребления кислорода. Вода : ГОСТ Р 52708–2007. – [Введ. 01.07.2008]. – М. : Госстандарт, 2008. – 14 с.
4. Пирог Т. П. Загальна мікробіологія : підручник / Т.П. Пирог – К. : НУХТ, 2004. – 471 с.
5. Сучасні біогазові технології [Електронний ресурс] / [ТОВ «Екотенк»]. – К. : Екотенк, 2011. – 10 с. – Режим доступу до статті:<http://ekotenk.com.ua/>.
6. Ястремська Л. С. Анаэробный метод розливу рідких поживних середовищ / Л. С. Ястремська // Наукові доповіді НУБіП. – 2011. – № 2. – С. 24–30.
7. Ястремская Л. С. Идентификация термофильных анаэробных микроорганизмов, изолированных из метантенка / Л. С. Ястремская // Микроб. журн. – 1993. – Т.55, в.6. – С. 3–12.

***Использование анаэробных микроорганизмов при биоконверсии  
отходов целлюлозно-бумажной промышленности***

***К.М. ЯБЛОНСКАЯ, Л.С. ЯСТРЕМСКАЯ, В.В. ХРОБУСТ***

***Национальный авиационный университет, г. Киев***

*Выделено новую анаэробную термофильную ассоциацию микроорганизмов, которая способна эффективно очищать сточные воды Киевского картонно-бумажного комбината с одновременным получением биогаза, кислот, спиртов и сброженной массы.*

***Ключевые слова:*** анаэробные микроорганизмы, биотопливо, сточные воды, сульфатредукция, метаногенез, химическое потребление кислорода, целлюлозные отходы.

*Use of anaerobic microorganisms bioconversion waste pulp and paper  
industry*

*K.M. YABLONSKAYA, L.S. YASTREMSKAYA, V.V. HROBUST*

*National Aviation University, Kyiv*

*Allocated a new anaerobic thermophilic bacteria association, which can effectively purify wastewater Kiev Cardboard and paper mill, while getting biofuels, acids, alcohols and fermented mass.*

**Key words:** *anaerobic bacteria, biofuels, waste water, sulfatredution, methanogenesis, chemical oxygen demand, cellulose waste.*