УДК 579.83+579.851.1

В. І. Карпенко, Л. С. Ястремська, Л. П. Голодок,
І. Г. Бурун, Я. В. Лембей, О. С. Татарченко

*Києво-Могилянська академія, Інститут мікробіології та вірусології НАН України,
Дніпропетровський національний університет, Національний авіаційний університет*

ЗАКОНОМІРНОСТІ ТРАНСФОРМАЦІЇ ПОЛІМЕРНИХ СПОЛУК У МЕТАН ТЕРМОФІЛЬНИМИ АНАЕРОБНИМИ БАКТЕРІЯМИ

Показано закономірності трансформації полімерних сполук у метан виділеними термофільними анаеробними бактеріями. Послідовність використання субстратів метангенеруючими бактеріями відповідає енергетичному виходу реакцій метаногенезу: у першу чергу використовується водень, потім – ацетат. Спільне культивування виділених різних анаеробних культур дає можливість збільшити вихід етанолу, водню та підвищити ефективність утворення метану.

The paper shows the regularities of polymer substances transformation into methane by extracted thermophilic anaerobic bacteria. The sequence of substrate use by the methane generating bacteria corresponds to the energy efficiency of the methane genesis reactions as in the first place hydrogen is used and then acetate is. Combined cultivation of extracted different anaerobic cultures gives the opportunity to increase ethanol and hydrogen yield as well as the effectiveness of methane formation.

Вступ

В аеробних умовах деструкція органічних речовин відбувається через їх повне окислення до простих органічних і мінеральних сполук. У природних анаеробних умовах їх окислення відбувається повільно й закінчується, як правило, утворенням відновлених продуктів: CH_4, H_2, H_2S, N_2, NH_3. Особливий інтерес викликає утворення метану, оскільки він – важливий елемент ланцюга біогеохімічного циклу кругообігу вуглецю. Утворення відновлених сполук забезпечує багатоступенева участь різних груп мікроорганізмів. Тому підвищений інтерес викликають дослідження, направлені на визначення основних груп мікроорганізмів, які беруть участь у цьому процесі, встановлення динаміки накопичення в середовищі бактеріальних метаболітів при анаеробному окисленні органічних речовин із метою отримання відновлених газових продуктів у вигляді енергоносіїв.

Матеріал і методи досліджень

Відбір зразків торфу, ґрунту, води та мулу прісних водойм проводили загальноприйнятими методами; осад і воду з моря відбирали з допомогою пробовідбірників на експедиційних суднах (НДС «Професор Водяницький», «Академік Вернадський», «Бентос»). Накопичувальні анаеробні мікроорганізми отримували при засіві поживних середовищ водою, мулом, ґрунтом, із джерел температурою +20, +30, +60°С, *pH* 6,0–8,0. Експерименти проводили на мінеральних середовищах наступного складу (г/л):

Середовище № 1. KH_2PO_4 – 0,4; $K_2HPO_4{\cdot}3H_2O$ – 0,4; NH_4Cl – 1,0; $MgCl_2{\cdot}6H_2O$ – 0,1; $CaCl_2{\cdot}2H_2O$ – 0,02; $NaHCO_3$ – 1,0; $Na_2S{\cdot}9H_2O$ – 0,5; розчин 0,2 % індикатора резазурину – 1 мл; розчин мікроелементів – 1 мл/л; розчин вітамінів [8] – 1 мл/л; вітаміни в ряді випадків замінювали дріжджовим екстрактом – 2 мл/л; вода дистильована – 1 л; *pH* середовища 7,0–7,5.

Середовище № 2. KH_2PO_4 – 0,33; NH_2Cl – 0,33; $MgCl_2{\cdot}2H_2O$ – 0,33; KCl – 0,33; $CaCl_2$ – 0,33; $NaHCO_3$ –1,5; $Na_2S{\cdot}9H_2O$ – 0,5; резазурин – 2 мл; вітаміни – 10 мл/л; мікроелементи – 1 мл/л; *pH* середовища – 7,0–7,3 [7].

© В. І. Карпенко, Л. С. Ястремська, Л. П. Голодок, І. Г. Бурун, Я. В. Лембей, О. С. Татарченко, 2006

Вісник Дніпропетровського університету. Біологія, екологія.
Visnik Dnìpropetrovs'kogo unìversitetu. Seriâ Bìologìâ, ekologìâ
Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology, ecology.
Visn. Dnìpropetr. Unìv. Ser. Bìol. Ekol.
2006. 14(2).
ISSN 2310-0842 print ISSN 2312-301X online
www.ecology.dp.ua

Середовище № 3. NH_4Cl – 0,9; $NaCl$ – 0,9; $MgCl_2$ – 0,2; KH_2PO_4 –0,75; K_2HPO_4 – 1,5; мікроелементи – 9 мл; 10 % $FeSO_4$ – 0,03 мл; резазурин 0,2 % – 1 мл; вітаміни – 5 мл; 10 % Na_2S – 10 мл додавали перед автоклавуванням [9]. До основного живильного середовища № 3 додавали 0,3 % дріжджового екстракту; 1 % триптону і 0,5 % глюкози (автоклавували окремо); *pH* середовища – 7,2–7,5.

Газова фаза складалась на 100 % з аргону. Окремо готували робочий розчин індикатора анаеробіозу та розчини відновних речовин [1]. Цитрат титану (III) готували за [10], сірководень за [3] із застосуванням у живильних середовищах відновників – сульфіду натрію [1], сірководню, цитрату титану (III) за [10] і резазурину як індикатора анаеробіозу. Якщо поява червоного забарвлення середовища не спостерігалася, це вказувало на забезпечення достатнього анаеробіозу в живильних середовищах. Розливали живильні середовища у флакони об'ємом 30, 250, 500 мл у безперервному потоці інертного газу, закривали пробками з бутилової гуми, а зверху загвинчували металевими ковпаками чи розливали у пробірки розміром 20 х 20 мм, які закупорювали пробками з чорної гуми та закріплювали дротом.

Флакони, пробірки при автоклавуванні розміщували у металевий бюкс, дотримуючись техніки безпеки, щоб при нагріві посуд не розірвало (автоклавували при 1,5 атм.). Середовище займало 1/3 об'єму.

У роботі використовували інертний газ аргон, який випускається вітчизняною промисловістю за Держстандартом 10157-79 і вміщує O_2 в концентрації не вище 0,0007 %. Тому відпадала необхідність пропускати газ через колонку для очищення від слідів кисню. Газові суміші, що вміщували водень і вуглекислий газ (у співвідношенні 4 : 1), вводили до культиватора методом витіснення, також без попереднього очищення. При заповнені флаконів газовою сумішшю використовували двоокис вуглецю (Держстандарт 8050-85).

Для отримання водню застосовували апарат СГС-2, до якого входили генератор водню та блок живлення. Водень отримували електрохімічно з 25 % розчину гідрату окислу калію з наступним очищенням від лугу та вологи при стабільній швидкості газового потоку, що встановлювався регулятором тиску на виході.

Розчини вітамінів, вуглеводів, антибіотиків стерилізували фільтруванням через фільтри Синпор № 8, 9. Їх зберігали окремо у анаеробних умовах і вносили до середовища безпосередньо перед посівом стерильним шприцом. Для виділення чистих культур із накопичувальних застосовували метод граничних розведень із наступним посівом на агаризоване середовище (з 2–2,5 % агаром) у чашках Петрі, пробірках чи флаконах, із метою отримання окремих колоній.

Для очищення метаногенних культур від супутньої мікрофлори використовували антибіотики кефзол, ампіокс, бензилпеніциліннатрієву сіль у концентрації 0,12 г/л.

Для виділення целюлозолітичних бактерій використовували середовище № 1. Як вуглецевий субстрат для целюлозолітичних бактерій використовували целюлозу, торф, водорості в кількості 10 г/л. Фільтрувальний папір застосовували у вигляді дрібних смужок, або подрібнювали його на гомогенізаторі. Торф і сухі водорості також подрібнювали з використанням гомогенізатора. При виділенні чистих целюлозолітичних культур застосовували целюлозу (1 %) або целобіозу (0,5 %).

Для сахаролітичних бактерій використовували целобіозу (0,5 %) або глюкозу (1 %). Інокулят бактерій (2 мл) вносили у флакон з 10 мл середовища і субстратом – фільтрувальним папером. Посіви інкубували протягом 5–7 діб.

Ріст культур оцінювали за величиною оптичної густини мікробної суспензії, яку вимірювали на фотоелектрокалориметрі ФЕК-56П при 540 нм у кюветі з довжиною

Вісник Дніпропетровського університету. Біологія, екологія.
Visnik Dnìpropetrovs'kogo unìversitetu. Seriâ Bìologìâ, ekologìâ
Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology, ecology.
Visn. Dnìpropetr. Unìv. Ser. Bìol. Ekol.
2006. 14(2).
ISSN 2310-0842 print ISSN 2312-301X online
www.ecology.dp.ua

світлового шляху 0,5 см, а також за виділенням газів – H_2, CO_2, CH_4. Ріст целюлозолітичних бактерій оцінювали також візуально – за ступенем руйнування целюлози.

Склад газів аналізували на хроматографі ЛХМ-8МД. Для визначення H_2, O_2, CH_4 використовували стальну колонку довжиною 1,5 м, діаметром 3 мм, заповнену молекулярними ситами 5а, фракції 0,25 мм. Для визначення CO_2 використовували стальну колонку довжиною 2,5 м, діаметром 3 мм, заповнену полісорбом-1. Температура колонок – +30°С, газ-носій – аргон, швидкість протоку – 30 мл/хв., детектор – катарометр, 80 мА. Проби газової фази (до хроматографа вводили 0,5 мл газової суміші) відбирали шприцом.

Визначення жирних кислот і спиртів проводили на хроматографі Chrom-5. Для визначення ацетату, етанолу, лактату, бутирату, пропіанату використовували скляну колонку довжиною 2,4 м, діаметром 3 мм, заповнену носієм паропаком-Q. Температура колонок – +190°С, випарника – +220°С, детектора – +200°С, газ-носій – гелій, швидкість його потоку – 30 мл/хв., детектор – полум'яно-іонізаційний, струм детектора – 150 мА. Проби центрифугували при 1000 *g* протягом 20 хвилин. Жирні кислоти та спирти визначали у супернатанті. Об'єм проб, що вводили до хроматографа, – 5 мкл.

Результати та їх обговорення

Із природних субстратів нами виділені накопичувальні анаеробні культури, що трансформують полімерні сполуки у метан. Отримана найактивніша термофільна накопичувальна культура, яка стабільно забезпечувала трансформацію целюлози у метан за 5–7 діб. Із накопичувальних анаеробних мікробних культур виділені чисті анаеробні культури: целюлозолітичний штам – *C. thermocellum 5CT*, сахаролітичний штам *C. thermosaccharolyticum 1S*, метаногенні культури – *Methanobacterium thermoautotrophicum 13M*, і *Methanosarcina thermophila 84MS*. Виділені штами ідентифіковані за 9-м виданням визначника Бергі [6] та оригінальними роботами [3; 4; 5]. Ізольовані анаеробні культури використовувалися для трансформації полімерних сполук в енергоносії як у монокультурах, так і у складі штучно створених мікробних термофільних асоціацій на базі вказаних культур (рис.).

Складання мікробних асоціацій здійснювали в такий спосіб.

1. Вирощували монокультури на середовищі № 1 протягом двох діб, як джерела вуглецю використовували 0,5 % целобіозу для штамів *5CT* і *1S*; метанол (5 моль/л для штаму *84MS*); воднево-вуглекислотну суміш у співвідношенні 4 : 1 для штаму *13M*.

2. При складанні асоціацій звернена увага на вік кожного штаму та співвідношення між кількістю різних культур, внесених до культиватора. Це необхідно для досягнення рівноваги в процесі конверсії основного джерела сировини (целюлози), яку використовували для метаногенезу. Для інтенсивного метаноутворення кількість целюлозолітичних і сахаролітичних клітин була удвічі більша, ніж метаногенних. Щільність клітинних суспензій монокультур становила для целюлозолітичних, сахаролітичних 0,8, метаногенів – 0,3–0,4 одиниці екстинкції, вік целюлозолітичного штаму 20–30 годин, сахаролітичного – 10 годин, метаногенів – 30–48 годин.

3. При спільному культивуванні мікроорганізмів як джерело вуглецю використовували 10 % целюлозу (фільтрувальний папір) або 0,5 % целобіозу.

Асоціацію *C. thermocellum 5CT* і *C. thermosaccharolyticum 1S* культивували на середовищі № 1 з целюлозою. Показано, що у процесі спільного культивування штамів продукти гідролізу целюлози (целобіоза, глюкоза) асимілюються сахаролітичним штамом *C. thermosaccharolyticum 1S*. Одночасно збільшується концентрація у середовищі водню удвічі порівняно з виділенням водню при рості штаму *5CT* у монокультурі, і етанолу – у 1,5 раза збільшується кількість ацетату (рис. *в*).

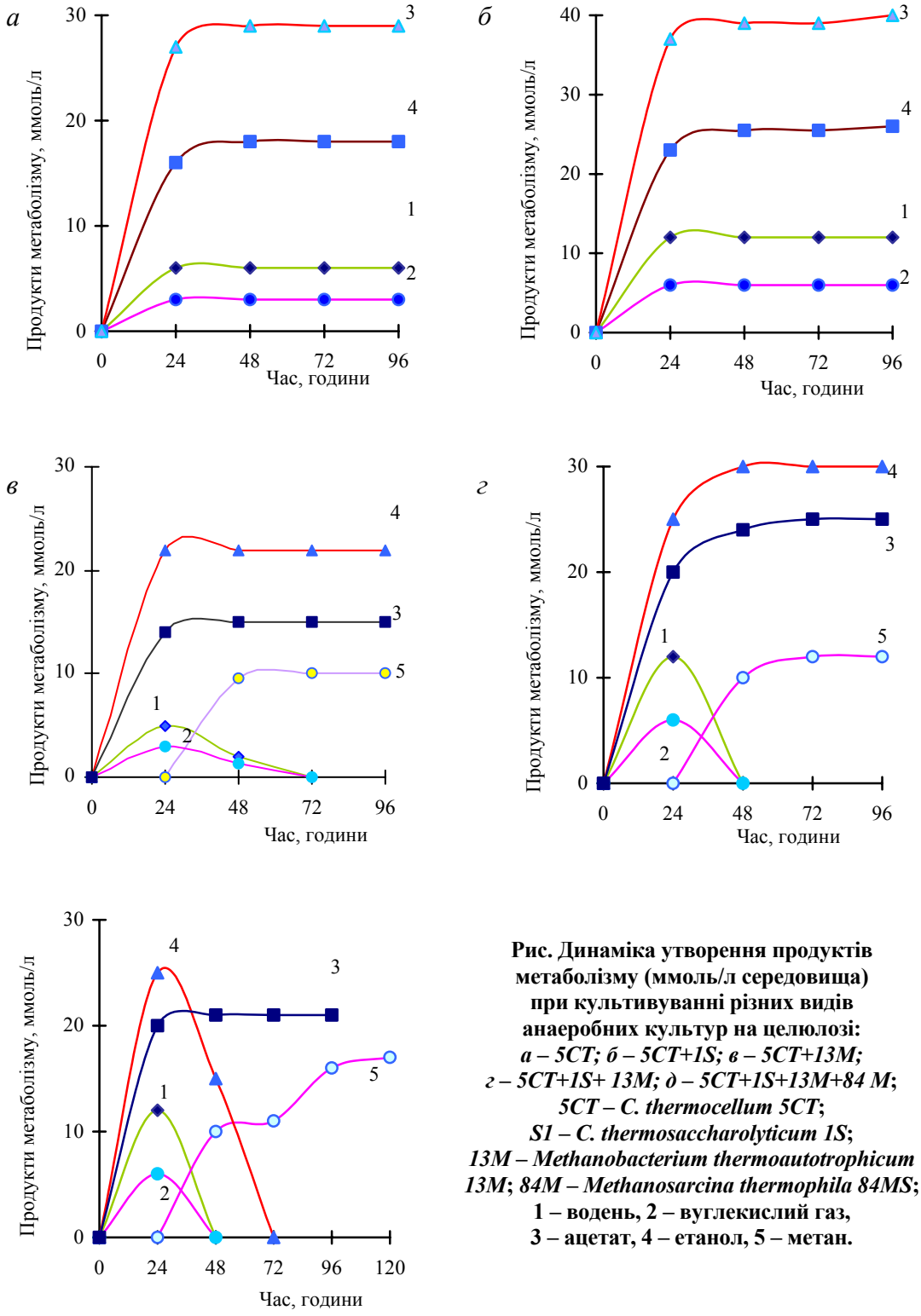

Рис. Динаміка утворення продуктів метаболізму (ммоль/л середовища) при культивуванні різних видів анаеробних культур на целюлозі:
***а – 5CT; б – 5CT+1S; в – 5CT+13M; г – 5CT+1S+ 13M; д – 5CT+1S+13M+84 M*;**
***5CT – C. thermocellum 5CT*;**
***S1 – C. thermosaccharolyticum 1S*;**
***13M – Methanobacterium thermoautotrophicum 13M*; *84M – Methanosarcina thermophila 84MS*;**
1 – водень, 2 – вуглекислий газ,
3 – ацетат, 4 – етанол, 5 – метан.

Вісник Дніпропетровського університету. Біологія, екологія.
Visnik Dnipropetrovs'kogo universitetu. Seriâ Biologiâ, ekologiâ
Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology, ecology.
Visn. Dnipropetr. Univ. Ser. Biol. Ekol.
2006. 14(2).
ISSN 2310-0842 print ISSN 2312-301X online
www.ecology.dp.ua

Спільне культивування штамів асоціації *C. thermocellum 5CT і Methanobacterium thermoautotrophicum 13M* супроводжувалося утворенням метану. Водень виявлявся у першу добу культивування, потім він активно споживався як субстрат штамом *13M*. У культуральній рідині накопичувались ацетат і етанол у кількостях, аналогічних при рості штаму *5CT* на целюлозі. Така асоціація нестабільна, тому що утворення метану здійснювалося тільки відновленням вуглекислоти воднем, а ацетат, що утворювався, інгібував ріст штаму *13M* і, можливо, лімітував швидкість утворення водню *C. thermocellum 5CT* (рис. *б*).

При вирощуванні асоціації з трьох різних монокультур (*C. thermocellum 5CT, C. thermosaccharolyticum 1S, Methanobacterium thermoautotrophicum 13M*) отримана ефективніша асоціація, тому що сахаролітичний штам *1S* активніше використовував проміжні продукти розкладу целюлози (глюкозу, целобіозу) зі збільшеним виходом водню. Але така асоціація також нестабільна, оскільки спостерігається підвищене нагромадження ацетату, що призводить до інгібування метаногенезу (рис. *а*).

Найефективніший гідроліз целюлози й утворення метану здійснювалися при культивуванні асоціації з чотирьох різних штамів *C. thermocellum 5CT, C. thermosaccharolyticum 1S, Methanobacterium thermoautotrophicum 13M, Methanosarcina thermophila 84MS.* Утворення метану відбувалось через споживання ацетату штамом *Methanosarcina thermophila 84MS* і відновлення вуглекислого газу воднем *M. thermoautotrophicum 13M*. Послідовність використання субстратів метанотвірними бактеріями відповідала енергетичному виходу реакцій метаногенезу: у першу чергу використовувався водень, потім ацетат (рис. *г*).

Висновок

Встановлено, що найефективніша трансформація целюлози у метан забезпечувалася при спільному культивуванні чотирьох штамів *C. thermocellum 5CT, C. thermosaccharolyticum 1S, M. thermoautotrophicum 13M, M. thermophila 84MS.* Утворення метану з целюлози проходило у чотири фази: накопичення етанолу, ацетату, водню за рахунок життєдіяльності культур *C. thermocellum 5CT* і *C. Thermosaccharolyticum 1S* з наступним споживанням ацетату штамом *M. thermophila 84 MS* у метан і відновлення вуглекислоти воднем у метан культурою *M. thermoautotrophicum 13M*. Послідовність використання субстратів метангенеруючими бактеріями відповідає енергетичному виходу реакцій метаногенезу: у першу чергу використовується водень, потім ацетат. Спільне культивування виділених анаеробних культур дає можливість підвищити вихід етанолу в 1,5 раза, водню – в 2 рази (культивування штамів *5CT* и *1S*), ефективність утворення метану – в 1,5 раза. Наведені дані вказують на встановлену можливість управління отриманням енергоносіїв із полімерних сполук.

Бібліографічні посилання

1. **Жилина Т. Н.** Образование цист метаносарциной / Т. Н. Жилина, Г. А. Заварзин // Микробиология. – 1979. – Т. 48, № 3. – С. 451–456.
2. **Таширев А. Б.** Техника выделения изолированных колоний анаэробных бактерий во флаконах / А. Б. Таширев, Я. Н. Данько, Д. В. Чернышенко // Микробиол. журн. – 1988. – Т. 50, № 4. – С. 89–90.
3. **Ястремская Л. С.** Идентификация термофильных анаэробных микроорганизмов, выделенных из метантенка // Микробиол. журн. – 1993. – Т. 55, № 6. – С. 8–17.

4.
5. **Batch W. E.** Methanogens: reevalution of unigue biological group / W. E. Batch, G. E. Fox, L. J. Magrum // Microb. Rev. – 1979. – Vol. 43. – P. 260–296.
6. **Cato E. P.** The genus *Clostridium* / E. P. Cato, W. L. George, S. M. Finegold // Bergey's manual of systematic bacteriology. – 1986. – Vol. 2. – P. 1141–1200.
7. **Jin F.** *Clostridium thermocopriae* sp. nov., a cellulolytic thermophile from animal feces, compost, soil and a hot spring in Japan / F. Jin, K. Yamasato, K. Toda // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1988. – Vol. 38, N 3. – P. 279–281.
8. **Pfennig N.** Uber das vitamin B_{ij}-bedurfnis phototropher schwefelbakterien / N. Pfennig, K. D. Lippert // Arch. Microbiol. – 1966. – Vol. 55. – P. 245–256.
9. **Wolin E. A.** Formation of methane by bacterial extracts / E. A. Wolin, M. L. Wolin, R. S. Wolfe // J. Biol. Chem. – 1963. – Vol. 238, N 8. – P. 2882–2886.
10. **Zeikus J. G.** Thermophilic bacterial: ecology, physiology and technology // Enzyme. Microbiol. Technol. – 1979. – Vol. 1. – P. 243–352.
11. **Zinder S. H.** Isolation and characterization of a thermophilic strain of *Methanosarcina unable* to use H_2–CO_2 for methanogenesis / S. H. Zinder, R. A. Mah // Appl. Environ. Microbiol. – 1979. – Vol. 38, N 5. – P. 996–1008.

Надійшла до редколегії 06.03.06.