

УДК 620.9.004.18 + 504.062.2

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

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

ВЗАЄМОДІЯ МІКРОБНИХ ПОПУЛЯЦІЙ У МЕТАНОГЕННИХ АСОЦІАЦІЯХ І ШЛЯХИ ЗБІЛЬШЕННЯ ВИХОДУ МЕТАНУ В МЕТАНТЕНКАХ

Розглянуті актуальні питання забруднення навколишнього середовища високополімерними сполуками. Дана оцінка можливості трансформації цих сполук анаеробними метаногенними асоціаціями мікроорганізмів і перетворення їх на енергоносії. Вивчено механізми взаємодії між окремими популяціями мікроорганізмів метаногенної асоціації. Проведено селекцію штамів мікроорганізмів, які брали участь у трансформації полімерів. Створені штучні мікробні асоціації. Вивчено вплив факторів навколишнього середовища на трансформацію високополімерних сполук анаеробними мікроорганізмами.

The article touches upon the burning questions of environmental contamination with high-polymeric compounds. The possibility of these compounds transformation into energy carriers with the help of anaerobic methanogenic associations has been estimated. The mechanisms of interaction between certain populations of methanogenic association microorganisms have been studied. The selection of the microorganisms, which took part in the transformation of polymers into energy carriers, has been carried out. Some artificial microbial populations have been created. The influence of outer factors on the processes of intensification and increase of obtained amounts of energy carriers in the course of high-polymeric compounds transformation by anaerobic microorganisms has been studied.

Вступ

Проблеми збереження якості навколишнього середовища та отримання енергії стають все актуальнішими. Певний вклад у їх вирішення може внести використання анаеробних бактерій для деградації та утилізації промислових, побутових, сільсько-

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

господарських твердих і рідких відходів, які отруюють і забруднюють природне середовище. Використання анаеробних мікроорганізмів – раціональний спосіб знешкодження, що дозволяє забезпечити трансформацію відходів у енергоносії, включити в енергетичний банк нові нетрадиційні, відновлювальні джерела енергії й, одночасно, отримувати інші практично цінні продукти [2; 3; 7–10].

Значну частку відходів складають високополімерні сполуки. Так, целюлоза у великих кількостях (близько $1,8 \times 10^{12}$ т/рік) утворюється рослинами, присутня у промислових, сільськогосподарських і побутових відходах. Целюлозовмісні відходи вважаються перспективними видами сировинних ресурсів для їх трансформації у джерела енергії (етанол, метан, водень), органічні кислоти (оцтова кислота, пропіонат, бутират), білково-вітамінні речовини, важливі ферменти (целюлази, геміцелюлази) тощо.

Для широкого використання трансформації полімерних сполук у енергоносії анаеробними мікроорганізмами важливо вирішити питання інтенсифікації та збільшення об'ємів отримання енергоносіїв із вказаних видів ресурсів. Цього можливо досягти впливом зовнішніх факторів на сировину чи мікроорганізми, вивченням механізмів взаємодії між групами мікроорганізмів, що беруть участь у трансформації полімерів у енергоносії, проведенням селекції активних форм вказаних мікроорганізмів, їх адаптацією до промислових умов отримання 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 судах (НДС «Професор Водяницький», «Академік Вернадський», «Бентос»). Накопичувальні анаеробні мікроорганізми отримували при засіві поживних середовищ водою, мулом, ґрунтом із джерел температурою +20, +30, +60°C, pH 6,0–8,0.

Експерименти проводили на мінеральних середовищах наступного складу (г/л):

Середовище № 1 «Р». 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 резаурину – 1 мл; розчин мікроелементів – 1 мл/л; розчин вітамінів [7] – 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_4Cl – 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; резаурин – 0,02; вітаміни – 10 мл/л; мікроелементи – по 1 мл/л; pH середовища – 7,0–7,3 [8].

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; резаурин 0,2 % – 1 мл; вітаміни – 5 мл; 10 % Na_2S – 10 мл добавляли перед автоклавуванням [9]. До основного поживного середовища № 3 додавали 0,3 % дріжджового екстракту; 1 % триптоні та 0,5 % глюкози (автоклаували окремо); pH середовища – 7,2–7,5.

Газова фаза складалась на 100 % з аргону. Окремо готували робочий розчин індикатора анаеробіозу та розчини відновлювальних речовин [1]; цитрат титану III готували за [10], сірководень – за [4]. При застосуванні в поживних середовищах відновлювачів (сульфіду натрію [1], сірководню, цитрату титану III за [10] і резаурину як індикатора анаеробіозу) поява червоного забарвлення середовища не спостерігалась, що вказувало на забезпечення достатнього анаеробіозу в поживних середовищах.

Розливали поживні середовища у флакони об'ємом 30, 250, 500 мл у безперервному потоці інертного газу, а потім їх закривали пробками з бутилової гуми та зверху загвинчували металевими ковпаками чи розливали в пробірки розміром

20 x 20 мм, які закупорювали пробками з чорної гуми і зверху закручували дротом. Флакони (пробірки) при автоклавованні розміщували у металевому боксі, дотримуючись заходів техніки безпеки, щоб при нагріванні не розірвало флакон (пробірку) чи не вибило пробку. Об'єм середовища займав 1/3 посудини. Поживні середовища автоклавували при 1,5 атм. У роботі використовували інертний газ аргон, який випускається вітчизняною промисловістю за ДСТУ 10157-79 і вміщує O_2 в концентрації не вище 0,0007 %. Тому відпадала необхідність пропускати газ через колонку для його очищення від слідів кисню. Газові суміші, що вміщували водень і вуглекислий газ (у співвідношенні 4 : 1), вводили до культиватора методом витіснення, також без попередньої очистки. При заповненні флаконів газовою сумішшю використовували двоокис вуглецю (ДСТУ 8050-85).

Для отримання водню застосовували апарат СГС-2, до якого входили генератор водню та блок живлення. Водень отримували електрохімічно з 25 %-ного розчину гідрату окислу калію з наступною очисткою від луку та вологи стабільною швидкістю газового потоку, що встановлювався регулятором тиску на виході.

Розчини вітамінів, вуглеводів, антибіотиків стерилізували фільтруванням через фільтри «Синпор» № 8 та 9. Їх зберігали окремо в анаеробних умовах і вносили до середовища безпосередньо перед посівом (стерильно шприцом). Для виділення чистих культур із накопичувальних застосовано метод граничних розведень із наступним посівом на агаризоване середовище (з 2,0–2,5 % агару) в чашки Петрі, пробірки чи флакони.

Для виділення целюлолітичних бактерій використовували середовище № 1. Як вуглецевий субстрат для целюлолітичних бактерій використовували целюлозу, торф, водорості в кількості 10 г/л. Фільтрувальний папір застосовували у вигляді дрібних смужок або подрібнювали на гомогенізаторі. Торф і сухі водорості подрібнювали механічним шляхом. При виділенні чистих целюлолітичних 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 та субстратом – фільтрувальним папером. Посіви інкубували протягом 5–7 діб.

Вплив зовнішніх факторів на життєдіяльність метаногенних асоціацій здійснювався шляхом опромінення активного анаеробного мулу метантенків дозами високочастотного опромінення (11,6 ГГц), що генерувалися високочастотним генератором.

Результати та їх обговорення

Із накопичувальних анаеробних мікробних культур нами виділені чисті анаеробні культури: целюлолітичний штам – *C. thermocellum* 5CT, сахаролітичний штам *C. thermosaccharolyticum* 1S, метаногенна культура *Methanobacterium thermoautotrophicum* 13M, метаногенна культура *Methanocarcina thermophila* 84MS. Ізольовані анаеробні культури використовували для трансформації полімерних сполук в енергоносії як у монокультурах, так і в складі штучно створених мікробних термофільних асоціацій на базі вказаних культур.

Встановлено, що найефективніший гідроліз целюлози у метан забезпечувався при спільному культивуванні всіх чотирьох штамів *C. thermocellum* 5CT + *C. thermosaccharolyticum* 1S + *Methanobacterium thermoautotrophicum* 13M + *Methanocarcina thermophila* 84MS. Утворення метану з целюлози відбувалося у три фази:

- накопичення етанолу, оцтової кислоти та водню за рахунок життєдіяльності культур *C. thermocellum* 5CT і *C. thermosaccharolyticum* 1S;
- перетворення оцтової кислоти на метан штамом *M. thermophila* 84MS;
- відновлення вуглекислоти воднем у метан штамом *M. thermoautotrophicum* 13M.

Послідовність використання субстратів метангенеруючими бактеріями відповідає енергетичному виходу реакцій метаногенезу: у першу чергу використовується водень, потім оцтова кислота. Спільне культивування різних штамів дає можливість підвищити вихід етанолу в 1,5, водню – в 2,0 рази (культивування штамів *5CT* і *1S*) і підвищити ефективність утворення метану (при спільному культивуванні всіх чотирьох монокультур).

За нашими підрахунками, в Україні технологію конверсії біомаси в паливо можна використовувати для переробки органічних відходів на енергоносії з одночасним отриманням високоякісних добрив [2; 3]. Відомо, що з 1 т органічних відходів і біомаси можна отримати 350 м³ газів (H_2 і CH_4), 430 л рідкого палива, твердого палива з теплою згорання 12300 кДж/кг. В Україні отримується 10 млн. т гною на рік, з якого можна отримати 0,6 млрд. м³ біогазу чи 0,48 млн. т умовної продукції на рік і одночасно у вигляді добрив 0,2 млн. т азоту, 0,1 млн. т окису фосфору, 0,4 млн. т окису калію.

Якщо 1000 м³ газу коштує \$ 80, то можна економити \$ 48 млн. за рахунок практичного використання біогазу. Сьогодні вартість газу невинно зростає, що підвищує ефективність практичного використання біологічної трансформації відходів в енергоносії. Якщо тонна добрив у середньому коштує \$ 200, можна економити \$ 1400 млн. за рахунок використання відходів у вигляді високоєфективних добрив. У зв'язку з тим, що на території України у сільській місцевості проживає 26 млн. людей, утворюється до 130 млн. т сухих органічних побутових відходів, переробка яких може дати 32,5 млрд. м³ біогазу чи 26 млн. т умовної продукції. Переробляючи біомасу на паливо, в Україні можна додатково отримати 2 млрд. м³ біогазу чи 1,6 млн. т умовної продукції з 10 млн. т соломи злакових, яка часто використовується як підстилка для худоби та пропадає у відходи.

Біотехнології отримання біогазу в метантенках можна використовувати й у системі очищення не тільки сільських, а й міських стічних вод. У метантенках створюються умови, що призводять до масового розвитку всіх організмів ланцюга анаеробного розкладу органічних речовин, включаючи метаногенні бактерії. Щоб досягти швидкого перетворення складних органічних речовин із вихідної сировини на метан, необхідно забезпечити існування якомога більшої кількості клітин у метантенку. При цьому в забродженій масі на етапі стоку з метантенка може міститись значна кількість мікробних клітин усіх мікробних форм ланцюга розкладу органічних речовин ($5,2-6,8 \times 10^{10}$ клітин/г; $2,5 \times 10^{11}$ клітин/г сухої речовини). Досягається це різними шляхами, наприклад частковим поверненням зброженої маси в метантенк, або через процес UASB (Upflow anaerobic sludge blanket; при цьому підтримуються умови, за яких мікроорганізми утворюють агрегати, що здатні легко осаджуватися).

Знизу в реактор подається сировина, і в цій зоні відбувається концентрація клітин метаногенів. Залежно від виду вихідної сировини, концентрації органічних речовин і температури, активність утворення біогазу досягає 0,4–8,4 л CH_4 /л сировини на добу [6]. Діяльність метаногенних мікроорганізмів спрямована на деструкцію органічних речовин. Деструкція високомолекулярних органічних речовин проходить у декілька етапів. Оскільки активний мул в метантенку не може перебувати досить тривалий час (постійно проходить процес надходження нових мас мулу та зливання зброженої маси з метантенка), можна припустити, що високомолекулярні ароматичні органічні сполуки не встигають пройти процес повної деструкції, а проходять його тільки частково. Тому навіть невелика інтенсифікація діяльності метаногенних бактерій може дозволити підвищити ефективність деструкції високомолекулярних органічних сполук.

Екологічний стан стічних вод, наприклад, міста Києва – одна з найважливіших проблем міста, оскільки вони є джерелом забруднення природних водойм міста, зокрема р. Дніпро. Дніпро – основне джерело питної води для Києва, тому для збереження її якості необхідно мати налагоджену систему очисних споруд. Очисткою стічних вод м. Києва займається Бортницька станція аерації. У 1997 році на споруди Бортницької станції аерації надходило 1358,5 тис. м³ стічної рідини на добу при проектній потужності 1800 тис. м³ на добу. Ефект очищення в середньому за рік складає: по завислих речовинах – 93,2 % (стоки, що надходять – 193,4 мг/л, після біологічної очистки – 13,2 мг/л); по БСК₅ – 96,2 % (стоки, що надходять – 136,4 мг O₂/л, після біологічної очистки – 5,2 мг O₂/л).

У метантенках при термофільному режимі в анаеробних умовах відбувається збродження органічних речовин, які входять до складу сирого осаду і надлишкового активного мулу. У процесі анаеробного бродіння осадів досягається також їх стабілізація та санітарне знезараження. Бродіння супроводжується виділенням газу (метану), який збирають у газові ковпаки, газові камери, газопроводи та газгольдери. Для підтримання процесу бродіння осад в метантенках підігривається за допомогою пари, яка вводиться інжекторами-підігрівачами. Пара подається з котельної, котли якої працюють на газовому паливі (використовується біогаз із метантенків і природний газ метан). Зброджений осад самопливом вивантажується з метантенків у резервуари-дозатори та перекачується насосами, встановленими в насосних станціях збродженого осаду, на мулові поля для зневоднення. На мулових майданчиках здійснюється зневоднення осаду. Надмулова вода, яка утворюється при зневодненні осаду, насосами перекачується в аеробні стабілізатори та скидається в Дніпро [5]. При моделюванні процесу культивування метаногенної асоціації активного мулу Бортницької станції в лабораторних умовах встановлено, що обробка мікробних культур мулу дозами високочастотного опромінення (11,6 ГГц) інтенсифікує життєдіяльність метаногенних мікроорганізмів і стимулює процес метаногенезу. Оптимальна тривалість високочастотного опромінення для інтенсифікації їх життєдіяльності при періодичних умовах культивування – 20 хвилин. Оптимальна кількість доз опромінення при періодичному культивуванні метаногенної асоціації мулу очисних станцій – два рази на добу (рис.).

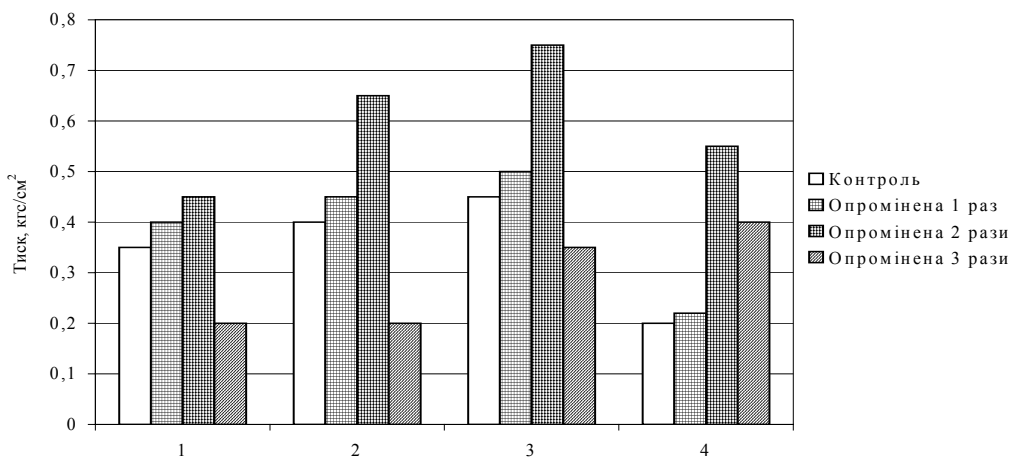


Рис. Кількість біогазу (тиск, кгс/см²), виділеного метаногенною асоціацією мулу очисної станції за добу залежно від періодичності високочастотного опромінення (11,6 ГГц по 20 хвилин) перед початком культивування мікроорганізмів на першу, другу, третю та четверту добу експерименту.

Співвідношення об'єму біогазу з проб, що були опромінені, до об'єму біогазу з контрольних проб становить 1,1: ефективність виділення біогазу збільшується на 10 %. Суттєве підвищення ефективності виділення біогазу свідчить про інтенсифікацію процесу метаногенезу, а звідси, – про збільшення ефективності очистки стічних вод. Перераховуючи дані дослідження на виробничі потужності Бортницької станції аерації за 1997 рік (коли кількість надлишкового мулу дорівнювала 6533,7 тис. м³, а кількість біогазу CH₄, що виділявся в процесі бродіння – 13067,4 тис. м³), при інтенсифікації процесу метаногенезу на 10 % ми одержимо збільшення кількості біогазу на 1306,7 тис. м³, а кількість надлишкового мулу зменшиться на 653,4 тис. м³. Енергетичні витрати на створення доз високочастотного опромінення незначні, тому ми їх не враховували.

Висновки

Вивчені механізми взаємодії між певними популяціями мікроорганізмів метаногенної асоціації, проведення селекція штамів мікроорганізмів, які брали участь у трансформації полімерів у енергоносії, створені штучні мікробні асоціації і вивчений вплив зовнішніх факторів на об'єми отримання енергоносіїв при трансформації високополімерних сполук анаеробними мікроорганізмами. Особлива увага приділена стану сучасних стічних вод м. Києва, інших міст України.

Пропонується проводити опромінення мікробних культур мулу дозами високочастотного опромінення (11,6 ГГц) для інтенсифікації процесу метаногенезу. Інтенсифікуючи процес метаногенезу, ми отримуємо подвійну користь: збільшуємо об'єм біогазу та підвищуємо ефективність очистки стічних вод. Це дозволить економити дефіцитні ресурси – природний газ, електроенергію, добрива.

Бібліографічні посилання

1. **Жилина Т. Н.** Образование цист метаносарциной / Т. Н. Жилина, Г. А. Заварзин // Микробиология. – 1979. – Т. 48, № 3. – С. 451–456.
2. **Карпенко В. І.** Конверсія біомаси і сільськогосподарських відходів у паливо в кліматичних умовах України / В. І. Карпенко, Б. В. Масліч // Збірник доповідей Міжнародної науково-технічної конференції з питань розвитку механізації, електрифікації і автоматизації сільськогосподарського виробництва в умовах ринкових відносин. – К., 1994. – С. 22.
3. **Карпенко В. І.** Перспективи отримання палива з використанням природних і штучно створених біосистем / В. І. Карпенко, Д. В. Чернишенко // Україна: людина, суспільство, природа. Тези наук. конф. – К., 1995. – С. 25.
4. **Таширеві А. Б.** Техніка виділення ізолюваних колоній анаеробних бактерій во флаконах / А. Б. Таширеві, Я. Н. Данько, Д. В. Чернышенко // Микробиол. журн. – 1988. – Т. 50, № 4. – С. 89–90.
5. **Технічний звіт** про роботу Бортницької станції аерації за 1997 рік. ДКО. – К.: Київводоканал, 1998. – 222 с.
6. **Ястремская Л. С.** Идентификация термофильных анаэробных микроорганизмов, выделенных из метантенка // Микробиологический журнал. – 1993. – Т. 55, № 6. – 8–17.
7. **Pfennig N.** Uber das vitamin B₁₂-bedurfnis phototropher schwefelbakterien / N. Pfennig, K. D. Lippert // Arch. Mikrobiol. – 1966. – Vol. 55. – P. 245–256.
8. **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.
9. **Zeikus J. G.** Thermophilic bacterial: ecology, physiology and technology // Enzyme. Microbiol. Technol. – 1979. – N 1. – P. 243–352.
10. **Zinder S. H.** Isolation and characterization of a thermophilic strain of Methanosarcina unable to use H₂-CO₂ for methanogenesis / S. H. Zinder, R. A. Mah // Appl. Environ. Microbiol. – 1979. – Vol. 38, N 5. – P. 996–1008.

Надійшла до редколегії 10.01.06.