

УДК 579.83+579.851.1

DOI: 10.20535/1810-0546.2016.3.53023

Л.А. Хрокало¹, А.І. Долман², В.Ю. Черненко¹¹Національний технічний університет України "КПІ", Київ, Україна²Університет штату Юта, Логан, Юта, США

МЕТАНОПРОДУКЦІЯ МЕЗОФІЛЬНИХ БАКТЕРІАЛЬНИХ УГРУПОВАНЬ, ВИДІЛЕНИХ ІЗ ВІДХОДІВ ТВАРИННИЦЬКИХ КОМПЛЕКСІВ

Background. The perspective substrates for elaboration of biopreparations in biogas technologies were considered.

Objective. The aim of the study is selection from farm wastes (pig manure, chicken excrements and fermented farm wastes) storage cultures of mesophilous bacteria communities, comparative analysis of methane producing, selection and identification of methane-producing bacteria cultures.

Methods. Bacteria cultures were grown in anaerobic conditions on liquid and solid Zhylyna nutrient media with addition of sodium acetate under temperature $+33 \pm 2$ °C. Content of gaseous metabolites was estimated by using gas chromatograph LHM-8MD. Culture patterns were taken in argon flow, were fixed, Gram stained and viewed in light microscope.

Results. All selected storage cultures efficiently produced methane, about 10–15 vol. % of methane has been accumulated in bottles since the 12th day of cultivation. Cultures selected from fermented wastes had high yields of methane emission is about 28 vol. %. Cultures of methane-producing bacteria were received by passages on liquid and solid nutrient media with addition of amoxicillin. Bacteria of *Methanosarcina* and *Methanosaeta* genus were identified.

Conclusions. Obtained cultures are perspective ones for elaboration of bacterial preparations and their further using in biogas technologies.

Keywords: Anaerobic mesophilous bacteria communities; Methane-producing bacteria; *Methanosarcina*; *Methanosaeta*.

Вступ

Відходи тваринництва спричиняють значне навантаження на навколишнє природне середовище. Їх утилізація має забезпечити виконання таких умов: зниження емісії небезпечних газів (метану, сірководню тощо), в т.ч. нейтралізацію неприємних запахів, запобігання зараженню тварин і людей збудниками інфекційних хвороб, попередження забруднення ґрунтів і природних вод. На користь широкого впровадження біогазових технологій додатково свідчить їх економічна рентабельність за рахунок одержання енергоносія біогазу, якісних добрив з високим вмістом доступних для рослин форм нітрогену і одержання вітаміну B₁₂, який використовують у тваринництві [1, 2]. На сьогодні біогазові технології набули поширення не тільки в агропромисловому комплексі та на станціях очистки стічних вод: їх застосовують також для утилізації відходів харчової промисловості [3], різноманітних ресурсів біомаси, таких як силос [1], водорості [4, 5] тощо. Сучасні наукові розробки в галузі проводять за такими напрямками: впровадження технологічних ліній збродування полікомпонентних субстратів на основі сільськогосподарських, лісгосподарських та промислових відходів; модернізація обладнання для підготовки субстрату, збродування та сис-

тем когенерації; розробка мікробних і ферментних препаратів.

Постановка задачі

Метою роботи є одержання накопичувальних бактеріальних культур із відходів тваринницьких комплексів та ферментованих відходів, аналіз газоподібних метаболітів мікробних асоціацій і оцінка їх продуктивності за емісією метану, виділення та ідентифікація культур метаногенних бактерій.

Матеріали і методи дослідження

Вихідний матеріал і загальні умови культивування. Об'єктами дослідження були мезофільні анаеробні бактеріальні угруповання, виділені з таких субстратів: гноївка свиноферми (Черкаська обл.), курячий послід (відходи агрокомплексу, Дніпропетровська обл.), переброджений залишок із лабораторних метантенків (НТУУ "КПІ", м. Київ). Бактеріальні угруповання вирощували на рідкому та щільному живильних середовищах відповідно до вимог стандартних методик [2, 6, 7]. Культивування проводили в анаеробних умовах з контролем показників окисно-відновного потенціалу середовища, недопущенням розвитку сульфатредуючих бактерій і

постійним відбором проб газоподібних метаболітів. Склад газоподібних метаболітів аналізували на газовому хроматографі ЛХМ-8МД (газ-носії – аргон, швидкість потоку – 30 мл/хв, детектор – катарометр, 80 мА). Статистичну обробку результатів (оцінку похибок вимірювань) проводили з використанням критерію Стьюдента.

Вирощування накопичувальних культур. Культивування проводили в скляних флаконах об'ємом 250 мл, щільно закритих гумовими корками і зафіксованих затискачами. Як живильне середовище використали модифіковане середовище Жиліної (в 1 л дистильованої води розчинили 1 г K_2HPO_4 , 1 г NH_4Cl , 0,1 г $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,3 г $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, NaHCO_3 – 1 г), до якого додавали відновник 0,5 г $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ та фактор росту (0,1 г дріжджового екстракту). Як джерело карбону в культуральне середовище вносили розчин ацетату натрію (2,5 г CH_3COONa на 1 л середовища). Як індикатор анаеробних умов був використаний 0,1 %-ний лужний розчин резауринату натрію, що має два варіанти зміни кольору залежно від редокс-потенціалу середовища (за $Eh \geq -100$ мВ забарвлюється в червоний колір, а за нижчих значень є безбарвним). Живильне середовище після додавання резаурину продували аргоном з метою видалення залишків кисню, герметично закривали та стерилізували в автоклаві за 1,5 атм. Розчини відновника ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) та дріжджового екстракту готували окремо, розчин відновника автоклаували за 1,5 атм, а розчин дріжджового екстракту – за 0,5 атм. До стерильного флакону із середовищем спочатку вносили ростовий фактор, а потім розчин сульфиду, вирівнюючи значення редокс-потенціалу до необхідного. Засів культур проводили за допомогою стерильного шприца, у флакони вводили по 5 мл інокуляту (розведеного дистильованою водою субстрату). Дослід закладали в п'яти повторях.

Флакони з накопичувальними культурами утримували в термостаті за температури $+33 \pm 2$ °С протягом 18 діб. Проби газової фази відбирали кожні три доби (по 2 проби газу з кожного флакона). Ріст мікробної біомаси в розчині визначали кожні дві доби за оптичною густиною культуральної суспензії, встановленою на фотоколориметрі КФК-2МП за довжини хвилі λ 540 нм.

Культивування та ідентифікація метаногенних бактерій. У складі клітинної стінки археобактерій, до яких належать метанутворювальні,

відсутній пептидоглікан, що робить їх стійкими до дії антибіотиків пеніцилінового ряду [6, 7]. Тому для отримання культур виключно метаногенних бактерій ми пересівали первинну накопичувальну культуру на середовища з додаванням амоксициліну в концентрації 0,12 г/л у флакони об'ємом 100 мл. Перший пересів проводили на рідке живильне середовище, а другий – на щільне. Культури метаногенних бактерій інкубували в термостаті за температури $+33 \pm 2$ °С, постійно контролюючи склад газової фази. На рідкому середовищі культивування проводили протягом 9 діб. Пересів культур на тверде середовище проводили за методом Хангейта в тонкий шар агару на стінках флакону [7, 8]. Культивування в агаризованому середовищі здійснювали протягом 7 діб. Мікроскопування протягом експерименту проводили 2 рази – на початку росту культури (друга доба) та на стадії інтенсивного виділення газу (коли спостерігали утворення бульбашок у товщі агару).

Зразки культури, відібраної в потоці аргону, фіксували, забарвлювали за Грамом, розглядали під імерсією, використовуючи світловий мікроскоп МІКРОМЕД 2. Ідентифікацію культур метаногенних бактерій проводили за визначником Бержі [9].

Результати і їх обговорення

У складі метаболітів накопичувальних культур були виявлені водень, вуглекислий газ, азот і метан (таблиця). Зростання продукції метану відбувалось рівномірно протягом усього експерименту, а з 12-ї доби культивування у флаконах було накопичено 10–15 об. % метану. Метанопродукція накопичувальних культур анаеробних бактерій, виділених із відходів свиноферми та курячого посліду, була приблизно однаковою. Найвищі показники продукції метану та водню мали накопичувальні культури, виділені з ферментованих відходів, взятих з метантенку. Таким чином, у біореакторі за рахунок зброджування багатокомпонентного субстрату (гноївки свиноферми з додаванням деревної тирси, соломи та яблучного жому) було сформоване стійке анаеробне бактеріальне угруповання.

Про ріст накопичувальних культур у флаконах свідчило зростання емісії газів і результати вимірів оптичної густини бактеріальної суспензії (рис. 1).

Таблиця. Склад газоподібних метаболітів накопичувальних культур мезофільних анаеробних угруповань

Доба	Джерело накопичувальної культури											
	Гноївка				Курачий послід				Ферментовані відходи			
	H ₂ ,%	CH ₄ ,%	N ₂ ,%	CO ₂ ,%	H ₂ ,%	CH ₄ ,%	N ₂ ,%	CO ₂ ,%	H ₂ ,%	CH ₄ ,%	N ₂ ,%	CO ₂ ,%
3	0,4 ± ± 0,07	2 ± ± 0,13	–	2 ± ± 0,12	–	1 ± ± 0,12	–	2,3 ± ± 0,1	2,42 ± ± 0,13	6 ± ± 0,12	–	3,6 ± ± 0,16
6	1,52 ± ± 0,08	5 ± ± 0,19	–	1,74 ± ± 0,14	0,21 ± ± 0,08	2 ± ± 0,16	0,1 ± ± 0,03	4,5 ± ± 0,12	2,5 ± ± 0,11	9 ± ± 0,14	0,28 ± ± 0,04	5,3 ± ± 0,13
9	2,5 ± ± 0,12	9 ± ± 0,11	0,38 ± ± 0,07	4,4 ± ± 0,18	0,36 ± ± 0,06	8 ± ± 0,19	0,11 ± ± 0,02	4,3 ± ± 0,11	5,1 ± ± 0,18	12 ± ± 0,18	0,39 ± ± 0,07	12,8 ± ± 0,19
12	2,42 ± ± 0,1	13 ± 0,18	0,6 ± ± 0,05	7,05 ± ± 0,15	0,5 ± ± 0,07	10 ± ± 0,18	0,5 ± ± 0,04	11,9 ± ± 0,14	7,9 ± ± 0,11	15 ± ± 0,16	0,5 ± ± 0,05	14,6 ± ± 0,2
15	1,6 ± ± 0,1	17 ± 0,13	0,5 ± ± 0,05	7,9 ± ± 0,1	0,4 ± ± 0,05	14 ± ± 0,16	0,5 ± ± 0,03	12,6 ± ± 0,15	5,6 ± ± 0,2	20 ± ± 0,2	0,6 ± ± 0,06	16,2 ± ± 0,18
18	1,61 ± ± 0,11	24 ± 0,11	0,6 ± ± 0,07	8 ± ± 0,11	0,7 ± ± 0,06	25 ± ± 0,19	0,64 ± ± 0,03	13 ± ± 0,14	5,7 ± ± 0,19	28 ± ± 0,18	0,6 ± ± 0,05	17,1 ± ± 0,16

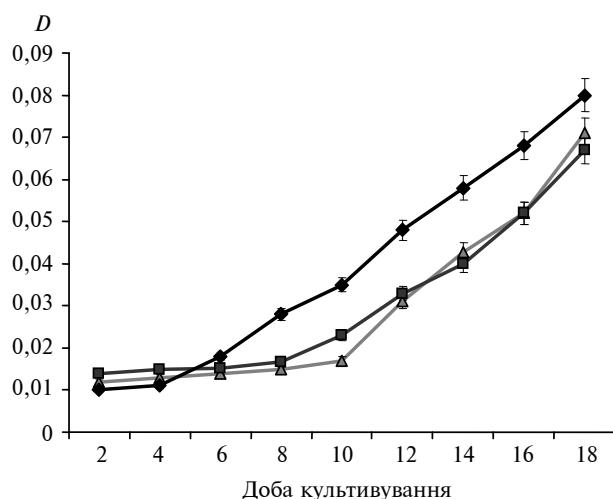


Рис. 1. Зміна оптичної густини суспензій первинних накопичувальних культур протягом 18 діб культивування: —▲— гноївка; —■— курачий послід; —◆— ферментовані відходи

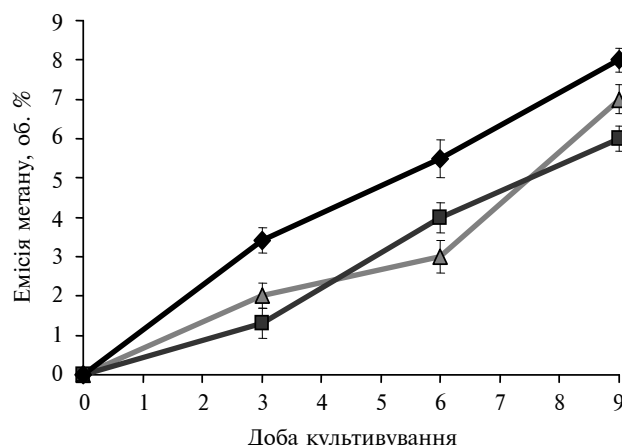


Рис. 2. Емісія метану культурами метаногенних бактерій, виділеними з відходів: —▲— гноївка; —■— курачий послід; —◆— ферментовані відходи

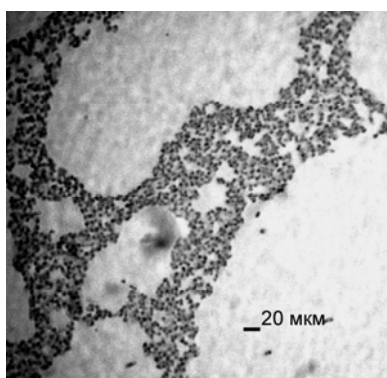
Культивування тривало 18 діб, при цьому було зареєстровано дві фази росту культур: лаг-фазу і фазу логарифмічного росту. Накопичувальна культура бактеріальних угруповань, одержана з ферментованих відходів біогазової установки, мала скорочену лаг-фазу (5 діб), натомість лаг-фаза для двох інших бактеріальних асоціацій тривала вдвічі довше.

Протягом культивування аналізували склад газових метаболітів, зокрема були порівняні показники виділення метану бактеріальними культурами, одержаними з різних відходів (рис. 2).

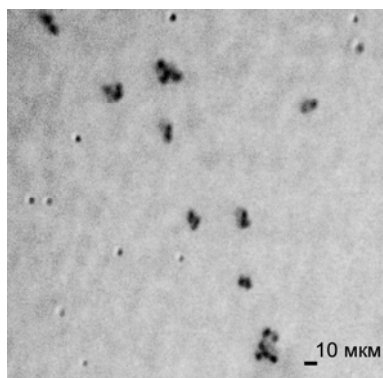
Результати наших досліджень показали, що валова продукція метану первинних нако-

пичувальних культур була дещо вищою, ніж у культур метаногенних бактерій, виділених від супутньої мікрофлори. Аналогічні дані були одержані іншими дослідниками [10]. Пояснення полягає в тому, що конверсія органічних речовин до метану може здійснюватись ефективно тільки складним бактеріальним угрупованням, в якому продукти метаболізму гідролітичних бактерій будуть максимально споживатись кислототвірними, ацетогенними та метаногенними бактеріями.

Ідентифікація метаногенних бактерій відповідно до визначальних таблиць довідника Бержі [9] базується на врахуванні умов куль-



а



б

Рис. 3. Клітини метанутворювальних бактерій роду *Methanosarcina*: а – мазок на склі, б – окремі агрегати клітин – “псевдосарцини”

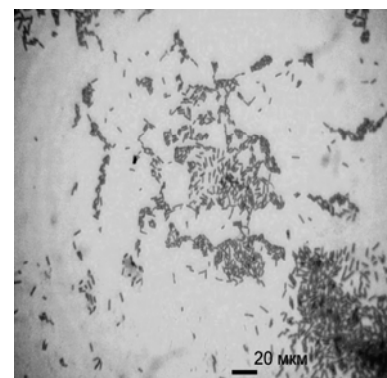


Рис. 4. Метанутворювальні бактерії роду *Methanosaeta* (мазок на склі)

тивування та морфологічних ознаках бактерій, оскільки для цієї групи відсутні селективні середовища [2, 6, 9]. Культивування проводили в облигатно-анаеробних умовах, за температури 30–35 °С, рН 7,0–8,0 і додавання ацетату натрію як джерела карбону і дріжджового екстракту як ростового фактору. Таким чином, всі виділені культури належать до порядку *Methanosarcinales*.

За морфологією клітин у полі зору мікроскопа було проведено ідентифікацію бактерій до роду. Грамнегативні коки, зібрані в неправильної форми кластери (поділ клітин відбувається в різних площинах), належать до роду *Methanosarcina* (рис. 3). Представники цього роду ендоспор не утворюють, нерухомі, швидко нарощують біомасу за 0,5 М NaCl, можуть фіксувати N₂, забарвлення за Грамом варіюється, розміри клітинних агрегатів становлять від 5 до 100 мкм [9].

Нерухомі грамнегативні палички (рис. 4) відносимо до роду *Methanosaeta*, бактерії як джерело енергії та карбону використовують виключно ацетати, в процесі метаболізму розкладаючи їх до CH₄ і CO₂.

Палички вкриті чохлам, розміри клітин 0,8–1,3×2–8 мкм, виживають за температури 10–45 °С, з оптимумом 35–20 °С, рН 5,5–8,4, з оптимумом 6,5–7,5 [9].

Висновки

Було проведено лабораторне культивування, ідентифікацію метаногенних бактерій і оцінено продуктивність за метаном анаеробних бактеріальних асоціацій, виділених із різних від-

ходів тваринництва. Аналіз продуктивності бактеріальних асоціацій, виділених із гноївки, пташиного посліду і ферментованих у метантенку відходів, довів можливість використання всіх дослідних зразків у створенні бактеріальних препаратів на їх основі. Застосування бактеріальних препаратів у промислових умовах дасть змогу утилізувати більшу кількість відходів і розширити їх спектр за рахунок відходів підприємств харчової промисловості тощо.

Наші дослідження показали, що найбільш перспективною сировиною є накопичувальні культури ферментованих відходів багатокомпонентного субстрату (гноївки свиноферми з додаванням деревної тирси, соломи та яблучного жому), оскільки вони мають скорочену лаг-фазу та підвищені показники метанопродукції. Проведена ідентифікація бактерій є важливою для одержання в майбутньому чистих культур, що є необхідною умовою для формування музею промислових культур мікроорганізмів та розробки нових біопрепаратів на основі штучних композицій.

Нами заплановані подальші дослідження в напрямі створення біопрепарату на основі штучних угруповань найбільш продуктивних штамів гідролітичних і метаногенних бактерій для переробки широкого спектра органічних відходів.

* * *

Частина експерименту було виконано на базі лабораторії відділу екстремофільних мікроорганізмів Інституту мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного. Висловлюємо щирю вдячність завідувачу відділу О.Б. Таширеву та співробітникам лабораторії.

Список літератури

1. Mruzek M., Groda B. Analysis of biogas production from grass silage, depending on its quality // *Acta Univ. Agric. et Silv. Mendel. Brun.* – 2011. – **59**, № 6. – P. 239–246.
2. Schnurer A., Jarvis A. *Microbiological Handbook for Biogas Plants: Swedish Gas Centre Report 207.* – Uppsala: SGG, 2010. – 138 p.
3. Cogeneration of hydrogen and methane from protein-mixed food waste by two-phase anaerobic process / W. Song, J. Cheng, J. Zhou et al. // *Int. J. Hydrogen Energy.* – 2010. – **35**. – P. 3141–3146.
4. Preatreatment of microalgae to improve biogas production: a review / F. Passos, E. Uggetti, H. Carrere, I. Ferrer // *Biore-sour. Technol.* – 2014. – **172**. – P. 403–412.
5. Ward A., Lewis D., Green F. Anaerobic digestion of algae biomass: a review // *Algal Res.* – 2014. – **5**. – P. 205–212.
6. Жилина Т.Н., Заварзин Г.А. Методы выделения и культивирования метанообразующих бактерий. – Пушино, 1978. – 75 с.
7. Wolfe R.S., Amy C.R., Stephen W.R. Techniques for cultivation methanogens // *Methods of Enzymology* / A. Rosenzweig, S. Ragsdale, Eds. – Salt Lake: Academic Press, 2011. – P. 1–22.
8. Wolfe R.S., Metcalf W.W. A vacuum-vortex technique for preparation of anoxic solution of liquid culture media in small volumes for cultivation methanogens of other strict anaerobes // *Anaerobe.* – 2010. – **16**, № 3. – P. 216–225.
9. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 1. The Archaea and the Deeply Branching, and Phototrophic Bacteria* / D.R. Boone, R.W. Castenholz, G.M. Garrity, Eds. – 2nd ed. – Springer, 2001. – 721 p.
10. Взаємодія мікробних популяцій у метаногенних асоціаціях і шляхи збільшення виходу метану в метантенках / В.І. Карпенко, Л.С. Ястремская, Л.П. Голодюк та ін. // *Вісник Дніпропетровського ун-ту. Сер. Біологія. Екологія.* – 2006. – **1**, вип. 14, № 3. – С. 80–85.

References

1. M. Mruzek and B. Groda, "Analysis of biogas production from grass silage, depending on its quality", *Acta Univ. Agric. et Silv. Mendel. Brun.*, vol. 59, no. 6, pp. 239–246, 2011.
2. A. Schnurer and A. Jarvis, "Microbiological handbook for biogas plants", SGG, Uppsala, Swedish Gas Centre Report 207, 2010, 138 p.
3. W. Song et al., "Cogeneration of hydrogen and methane from protein-mixed food waste by two-phase anaerobic process", *Int. J. Hydrogen Energy*, vol. 35, pp. 3141–3146, 2010.
4. F. Passos et al., "Preatreatment of microalgae to improve biogas production: a review", *Bioresour. Technol.*, vol. 172, pp. 403–412, 2014.
5. A. Ward et al., "Anaerobic digestion of algae biomass: a review", *Algal Res.*, vol. 5, pp. 205–212, 2014.
6. T.N. Zhilina and G.A. Zavarzin, *Methods of Selection and Cultivation of Methane-Forming Bacteria.* Puschino, USSR, 1978, 75 p. (in Russian).
7. R.S. Wolfe et al., "Techniques for cultivation methanogens", in *Methods of Enzymology*, A. Rosenzweig and S. Ragsdale, Eds. Salt Lake: Academic Press, pp. 1–22, 2011.
8. R.S. Wolfe and W.W. Metcalf, "A vacuum-vortex technique for preparation of anoxic solution of liquid culture media in small volumes for cultivation methanogens of other strict anaerobes", *Anaerobe*, vol. 16, no. 3, pp. 216–225, 2010.
9. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 1. The Archaea and the Deeply Branching, and Phototrophic Bacteria*, D.R. Boone et al., Eds., 2nd ed. Springer, 2001, 721 p.
10. V.I. Karpenko et al., "Interaction of microbial populations in methanogenic communities and directions of methane emission increasing in methane-tanks", *Visnyk Dnipropetrovskogo Universytetu. Ser. Biologia. Ecologia*, vol. 1, iss. 14, no. 3, pp. 80–85, 2006 (in Ukrainian).

Л.А. Хрокало, А.І. Долман, В.Ю. Черненко

Метанопродукція мезофільних бактеріальних угруповань, виділених із відходів тваринницьких комплексів

Проблематика. Розглянуто перспективні субстрати для розробки біологічних препаратів у технологіях одержання біогазу.

Мета дослідження. Метою роботи є виділення з відходів тваринництва (гноївки свиноферми, курячого посліду, ферментованих відходів) накопичувальних культур мезофільних анаеробних бактеріальних угруповань, оцінка їх продуктивності за метаном, виділення та ідентифікація культур метаногенних бактерій.

Методика реалізації. Культури бактерій вирощували в анаеробних умовах на рідкому та агаризованому середовищах Жилиної з додаванням ацетату натрію за температури $+33 \pm 2$ °С. Склад газоподібних метаболітів аналізували на газовому хроматографі ЛХМ-8МД. Зразки культури, відібраної в потоці аргону, фіксували, забарвлювали за Грамом і мікроскопували.

Результати дослідження. Всі виділені накопичувальні культури достатньо ефективно продукували метан, з 12-ї доби культивування у флаконах містилось 10–15 об. % метану. Наприкінці експерименту найвищі показники продукції метану (28 об. %)

мали накопичувальні культури бактеріальних угруповань, виділені з ферментованих відходів тваринництва. Культури метаногенних бактерій одержали серією пересівів на рідке та тверде живильні середовища з додаванням амоксициліну. Було ідентифіковано представників родів *Methanosarcina* та *Methanosaeta*.

Висновки. Одержані культури є перспективними для розробки бактеріальних препаратів та їх подальшого використання в біогазових технологіях.

Ключові слова: Анаеробні мезофільні бактеріальні угруповання; Метанпродукуючі бактерії; *Methanosarcina*; *Methanosaeta*.

Л.А. Хрокало, А.И. Доломан, В.Ю. Черненко

Метанопродукция мезофильных бактериальных сообществ, выделенных из отходов животноводческих комплексов

Проблематика. Рассмотрены перспективные субстраты для разработки биологических препаратов в технологиях получения биогаза.

Цель исследования. Целью работы было выделение из отходов животноводства (навоза свинофермы, куриного помета, ферментированных отходов) накопительных культур мезофильных анаэробных бактериальных сообществ, оценка их продуктивности по метану, выделение и идентификация культур метанобразующих бактерий.

Методика реализации. Культуры бактерий выращивали в анаэробных условиях на жидкой и агаризованной средах Жилиной с добавлением ацетата натрия при температуре $+33 \pm 2$ °С. Состав газообразных метаболитов определяли на газовом хроматографе ЛХМ-8МД. Образцы культуры, отобранные в потоке аргона, фиксировали, окрашивали по Грамму и микроскопировали.

Результаты исследования. Все выделенные накопительные культуры достаточно эффективно продуцировали метан, на 12-е сутки культивирования во флаконах содержалось около 10–15 об. % метана. В конце эксперимента самые высокие показатели продукции метана (28 об. %) имели накопительные культуры бактериальных сообществ, выделенные из ферментированных отходов животноводства. Культуры метаногенных бактерий получили путем серии пересевов на жидкую и твердую питательные среды с добавлением амоксицилина. Были идентифицированы представители родов *Methanosarcina* и *Methanosaeta*.

Выводы. Полученные культуры являются перспективными для разработки бактериальных препаратов и их последующего использования в биогазовых технологиях.

Ключевые слова: Анаэробные мезофильные бактериальные сообщества; Метанпродуцирующие бактерии; *Methanosarcina*; *Methanosaeta*.

Рекомендована Радою
факультету біотехнології і біотехніки
НТУУ “КПІ”

Надійшла до редакції
28 вересня 2015 року