

УДК 579.6:663.1

ОТРИМАННЯ МОЛЕКУЛЯРНОГО ВОДНЮ МЕЗОФІЛЬНИМИ АНАЕРОБНИМИ АСОЦІАЦІЯМИ МІКРООРГАНІЗМІВ ПРИ ДЕСТРУКЦІЇ ХАРЧОВИХ ВІДХОДІВ

С.Д. КАЛЬСІНА

Національний авіаційний університет, м. Київ

*З різних екосистем виділено три мезофільні воденьутворюючі анаеробні асоціації мікроорганізмів. Виявлено, що за фенотиповими ознаками виділені бактерії можна віднести до родів *Bacillus* sp. та *Clostridium* sp. Досліджено їх оптимальні умови культивування, за яких синтезується найбільша кількість водню. Виявлено, що коефіцієнт деструкції воденьутворюючими анаеробними асоціаціями мікроорганізмів овочевих відходів більше у 2 рази, ніж у фруктових відходів.*

Ключові слова: *біогаз, біоводень, анаеробні мікроорганізми, *Bacillus*, *Clostridium*, харчові відходи.*

Вступ. Харчові відходи та їх накопичення стають критичною проблемою в усьому світі. Лише в Україні виробляється за рік близько 22,5 млн тон харчових відходів на рік [1]. Одним з напрямів вирішення проблеми відходів є їх переробка в різні види біопалива. Одним з перспективних видів біопалива може стати молекулярний водень (H_2), що виділяється деякими мікроорганізмами [2-6]. Потенційними субстратами для виробництва біоводню є сільськогосподарські та харчові відходи. Спосіб утилізації відходів з використанням мікроорганізмів виглядає подвійно ефективним і корисним – мікроорганізми здатні утилізувати екологічно небезпечні органічні відходи і при цьому синтезувати екологічно чисте паливо – H_2 [3]. Одними з таких мікроорганізмів є бактерії родів *Bacillus* та *Clostridium* [5].

Пошук, виділення та вивчення анаеробних воденьутворюючих бактерії є важливим етапом в отриманні молекулярного водню, як енергоносія в процесі збродження органічних відходів.

Метою роботи є – отримання молекулярного водню мезофільними анаеробними асоціаціями мікроорганізмів при деструкції харчових відходів.

Матеріали та методи. Для виділення анаеробних воденьутворюючих мікроорганізмів з різних екосистем були вибрані такі зразки, як ґрунт немитої неочищеної картоплі (ГК), ґрунт теплиці НАУ (ГТ) та пташиний послід (ПП).

Для культивування анаеробних мікроорганізмів готували скляний градуйований посуд об'ємом 250 та 500 мл, гумові корки, металеві зажими. Експерименти проводили на середовищі (г/л): водопровідна вода – $\frac{2}{3}$ об'єму флакону; CaCO_3 – 0,1-0,2 г; розчин 0,1% резазуринату натрію – 1 мл; субстрати: картопля (картопляний затор), овочеві відходи (лушпиння картоплі, буряку, моркви), фруктові відходи (лушпиння яблука і банану) – 50 г; рН середовища складало 6,8-7,3.

Асоціації мікроорганізмів виділяли на картопляному заторі, який класично [7] використовується для отримання накопичувальної культури анаеробних спороутворювальних бактерій. Субстрати готували наступним чином: картоплю нарізали кубіками (1-2 × 1-2 см), а відходи дуже маленькими шматочками до 0,5 см.

Для виділення воденьутворюючих мікроорганізмів, які утворюють спори флакони зі зразками і середовищем пастеризувати на водяній бані під ватно-марлевими пробками протягом 5 хв за температури $t = 100$ °С з моменту закипання. Потім на всіх флаконах замінювали ватно-марлеві пробки на гумові пробки та металеві зажими. Отриманий посівний матеріал використовували для подальших досліджень.

Культури інкубували за температури 30 °С 5-7 діб. Для отримання селекціонованої накопичувальної культури проведено чотири пасажі.

Для виділення чистої культури анаеробних мікроорганізмів на агаризованому середовищі застосовували метод модифікований метод Хангейта у скляних флаконах [8].

Ріст культур оцінювали візуально за ступенем деструкції субстратів, виділенням газів – H_2 , зміни рН і Eh середовища.

Для потенціометричного визначення рН та значень окисно-відновного потенціалу (Eh) середовища використовували комбінований рН-метр-мілівольтметр «EZODO MP-103»; рН вимірювали виносним електродом РУ41 і термодатчиком. Для вимірювання Eh застосовували платиновий вимірювальний електрод ЕПВ-1 та хлорсрібний електрод порівняння ЭВЛ-1М3 [5].

Окисно-відновного потенціал також визначали за зміною забарвлення індикатору резазуринату натрію у середовищі [9]. Він має дві фази зміни кольору:

- перша фаза, при $Eh = -50$ мВ, фіолетовий резазурин незворотно відновлюється до резорурфіну, що має яскравий червоно-рожевий колір,
- друга фаза, при $Eh \leq -100$ мВ, резорурфін відновлюється до безбарвної сполуки – лейкорезорурфіну.

За значенням Eh спостерігали зміну умов зброджування субстрату та анаеробність середовища.

Кількість виділеного газу розраховували за формулою:

$$H_2 = \frac{V * M}{m},$$

де: H_2 – кількість виділеного водню (л/кг); V – кількість виділеного водню в л; M – маса відходів (кг); m – маса відходів, які були використані в досліді (0,05 кг).

Для визначення кількості виділеного біоводню застосовували водяний затвір. З градуйованного флакона під тиском утворюваного газу витіснялася вода (рис. 1).



Рис. 1. Підготовлені флакони до культивування: 1 – флакон з середовищем; 2 – градуйований флакон з водою 250 мл; 3 – градуйований флакон 250 мл для прийому витісненої води

Коефіцієнт деструкції (Кд) субстрату при культивуванні анаеробних асоціацій розраховували як $m_1 : m_2$ (де m_1 і m_2 – початкова та кінцева абсолютно суха маса (АСМ) субстрату). Для визначення кінцевої маси субстрату детрит після деструкції відокремлювали фільтруванням через зважений паперовий фільтр, висушували до постійної ваги за температури 100°C та зважували. Тривалість деструкції визначали як а) час, протягом якого частки картоплі чи змішаних харчових відходів повністю руйнувались до детриту; б) час до припинення газоутворення.

Морфологію клітин вивчали на мікроскопі «ЛОМО МИКМЕД-2» при збільшенні $\times 1500$. Для дослідження морфологічних властивостей мікроорганізмів були застосовані прості та складні способи забарвлення клітин [10]. Вивчення фізіолого-біохімічних ознак виділених бактерій проводили за загально-відомими методами [11]. Ідентифікацію виділених організмів проводили за 9-м визначником бактерій «Определитель бактерий Берджи» [12].

Результати досліджень та їх обговорення. Виділено три мезофільні накопичувальні культури анаеробних воденьутворюючих мікроорганізмів ГК-1,

ГТ-2, ПП-3 з різних екосистем, які активно синтезували водень за температури 30°C, $E_h \leq -150$ мВ, рН = 6,8–7,3 (табл.1, рис.2).

Таблиця 1

Накопичувальні воденьутворюючі культури виділені з різних екосистем, які використовують у якості субстрату картоплю

№ зразка	Екосистема	Кількість H_2 , л/кг	рН	E_h , мВ	Виділена культура
1	грунт неочищеної картоплі	10,5	7,0	-200	ГК-1
2	грунт теплиці НАУ	5,5	6,8	-150	ГТ-2
3	пташиний послід	9,0	7,3	-220	ПП-3

Накопичувальні мезофільні культури вже на дванадцятю годину починали руйнування картоплі, культуральна рідина мутніла, утворювалася піна на поверхні, картопля впливала та відбувалося активне газоутворення (рис. 2).

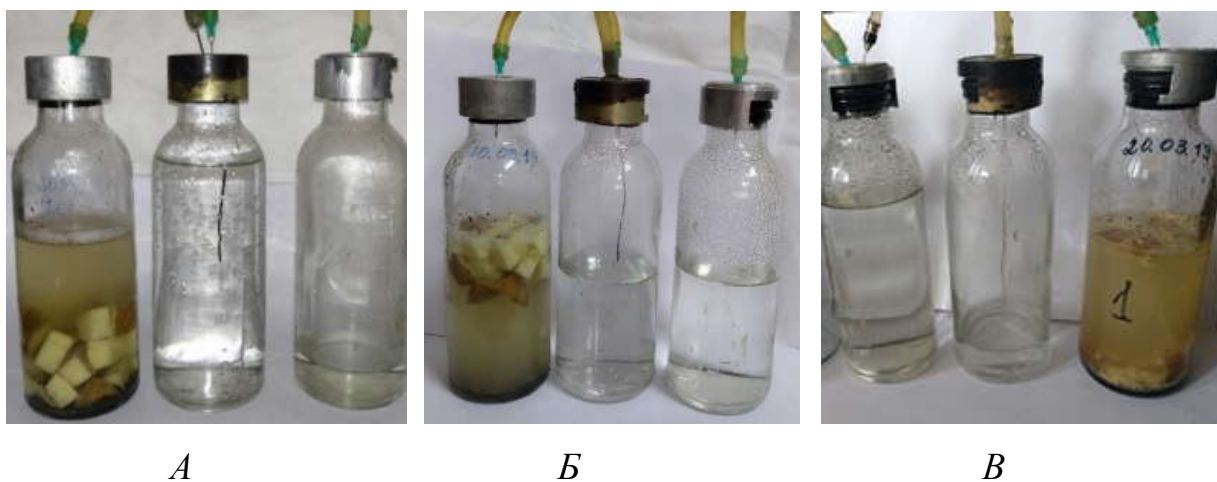


Рис. 2. Динаміка росту асоціацій ГК-1, ГТ-2, ПП-3 та утворення біогазу:

A – на першу добу; *B* – другу добу; *B* – п'яту добу культивування

Окисно-відновний потенціал починав знижуватися з $E_h = +150$ мВ...–150 мВ, рН з 7,5 до 6,5 (рис. 3). На 3–4 добу – біогазу синтезувалося до 8 л/кг, картопля була на дні, деяка частина у вигляді маленьких частинок, рН = 5,5–6,0.

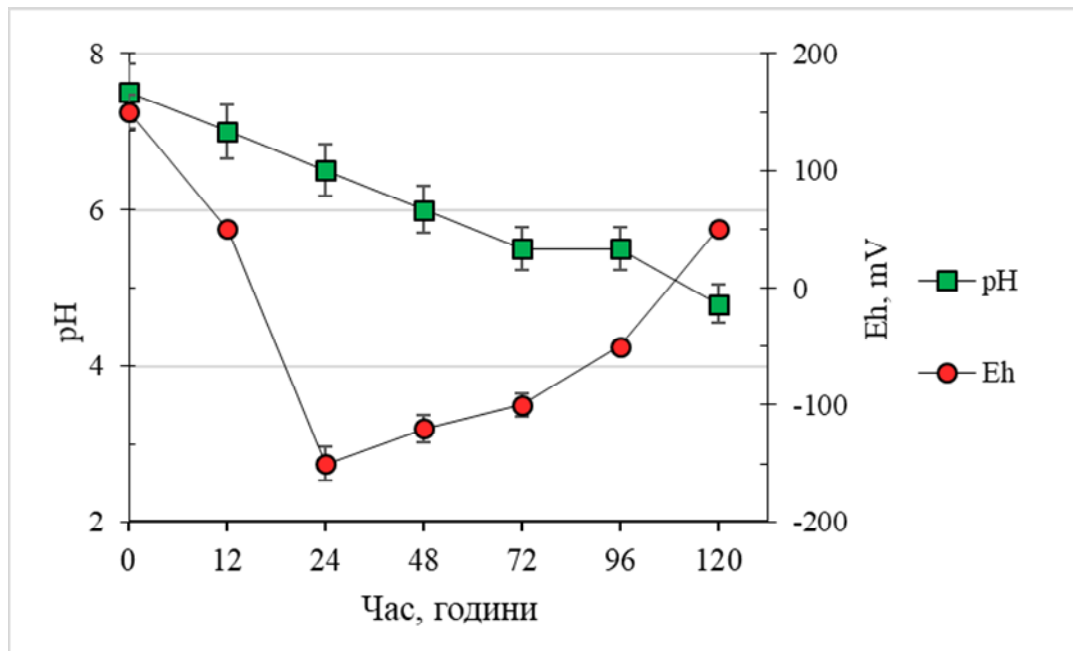


Рис. 3. Зміна рН і Eh в процесі деструкції картоплі анаеробними асоціаціями мікроорганізмів

На п'яту добу – більшість картоплі перетворилась на однорідну масу, рН = 4,8; Eh = –50 мВ, присутня невелика кількість піни (рис. 2, В). Найбільша кількість біогазу виділилася культурою ГК-1 – до 10,5 л водню/кг за 5 діб (рис. 4).

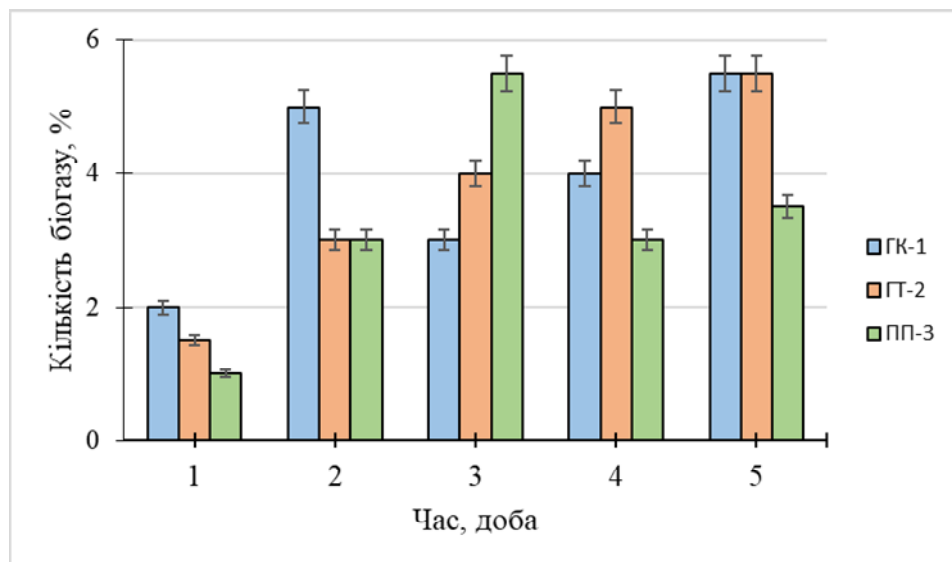


Рис. 4. Кількість синтезованого біогазу анаеробними асоціаціями мікроорганізмів ГК-1, ГТ-2, ПП-3 в процесі деструкції картоплі за п'ять діб

Дослідження морфології клітин показало, що селекціоновані анаеробні воденьутворюючі асоціації ГК-1, ПП-3 є грампозитивними, паличкоподібними бактеріями різних розмірів, розташованими попарно або ланцюжками, які утворювали овальні спори бацилярного або клостридіального типу.

Обидва морфотипи утворювали сірководень, мали негативну реакцію на каталазу та проявляли амілазну активність. Морфотип №1, на відміну від морфотипу №2, утворював гранульозу і розріджував желатину. Колонії морфотипів безбарвні, мали круглу форму, розмір 1-3 мкм, гладеньку поверхню, опуклий профіль; відрізнялися за блиском (колонії морфотипу № 1 – блискучі, № 2 – матові), краєм (№ 1 – гладенький, № 2 – хвилястий) та структурою (№ 1 – однорідна, № 2 – дрібно-зерниста).

Проведена первинна ідентифікація мікроорганізмів за фенотиповими ознаками до роду і визначено, що виділені асоціації мікроорганізми можна віднести до родів *Bacillus sp.* та *Clostridium sp.*

Деструкція харчових відходів виділеними асоціаціями. Виділені анаеробні воденьутворюючі асоціації мікроорганізмів ГК-1 та ПП-3 використовували для деструкції харчових відходів – овочів (картопля, буряк, морква) та фруктів (яблуко, банан). Культивували 5 діб, за температури 30 °С.

Найбільш інтенсивне бродіння з продукуванням біоводню відбувалося вже на першу добу обома асоціаціями. Спостерігали значне зниження Eh з +200 мВ до -100...-150 мВ та рН з нейтральних значень 6,8–7,3 до кислих 5,0–5,5 (рис. 5, 6), що спричинено життєдіяльністю мікроорганізмів роду *Bacillus*, які активно розмножувалися, знижували незначну концентрацію кисню в середовищі до анаеробних умов коли, починали розмножуватися та продукувати біоводень мікроорганізми роду *Clostridium* [6].

Внесення буферного розчину гідроксиду натрію дозволяло контролювати рН в межах 6,8–7,3.

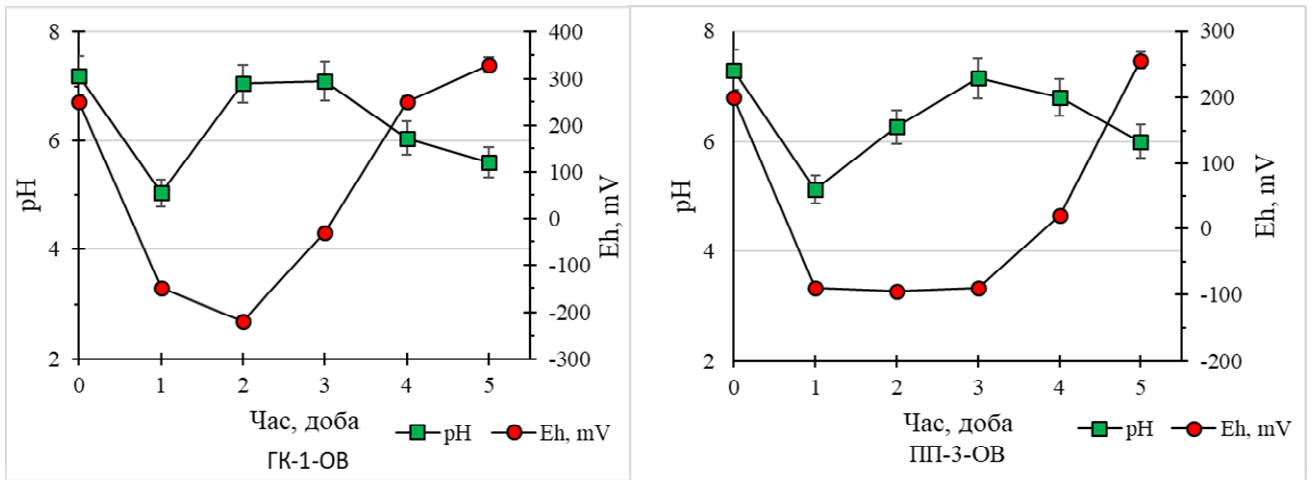


Рис. 5. Зміна рН і Eh в процесі деструкції овочевих відходів анаеробними асоціаціями мікроорганізмів GK-1-OB та PPI-3-OB

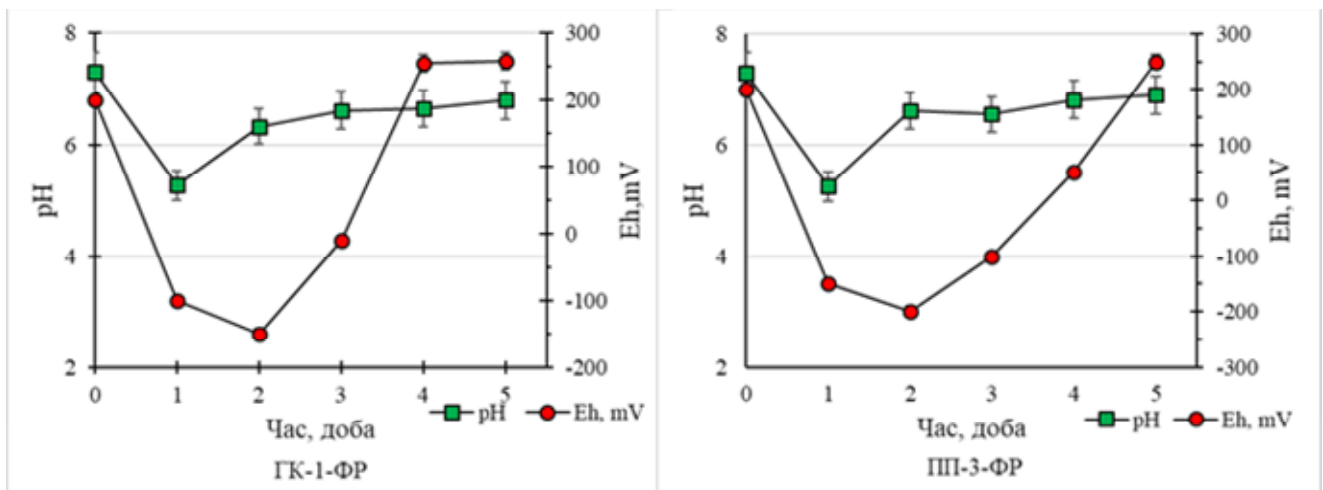


Рис. 6. Зміна рН і Eh в процесі деструкції фруктових відходів анаеробними асоціаціями мікроорганізмів GK-1-FR та PPI-3-FR

Максимальне утворення водню спостерігали на другу та третю добу – до 4 л/кг культурами GK-1-OB, GK-1-FR та PPI-3-OB (рис. 7). Загально за п'ять діб було виділено 8,8 л H_2 на 1 кг харчових відходів культурою GK-1-OB; 4,4 л/кг – культурою GK-1-FR; 7,2 л/кг – культурою PPI-3-OB; 3 л/кг – культурою PPI-3-FR.

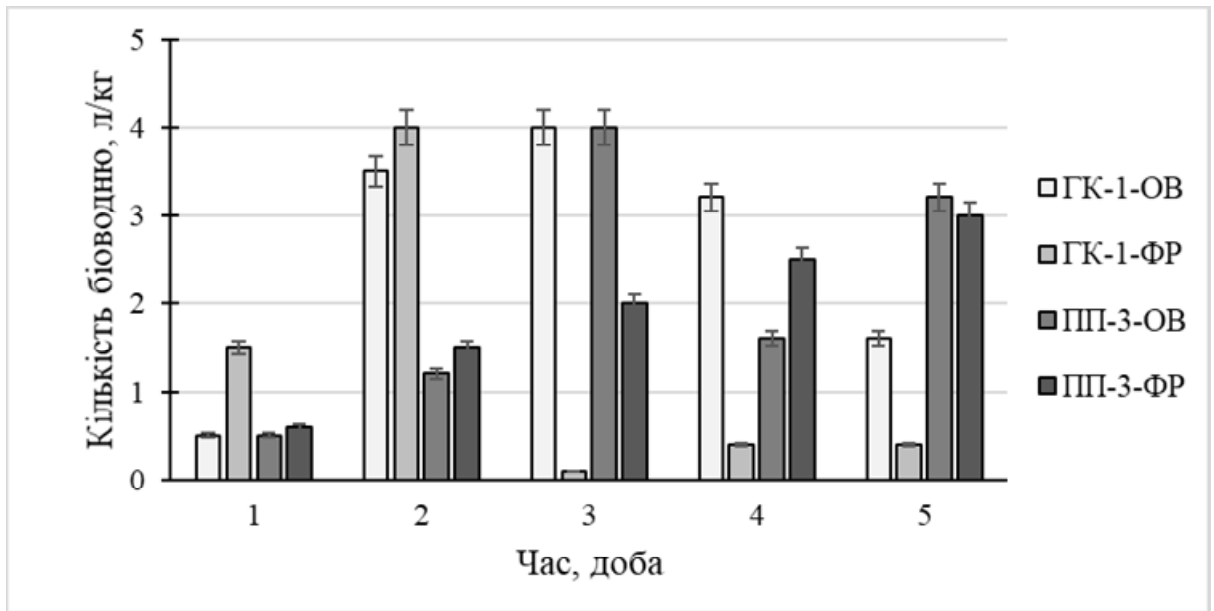


Рис. 7. Кількість виділеного біогазу анаеробними асоціаціями мікроорганізмів в процесі деструкції овочевих та фруктових відходів за п'ять діб

Коефіцієнт деструкції харчових відходів анаеробною воденьутворюючою асоціацією мікроорганізмів ГК-1-ОВ становило 4,2; ГК-1-ФР– 1,5; ПП-3-ОВ – 5; ПП-3-ФР– 1,8 (рис. 8).

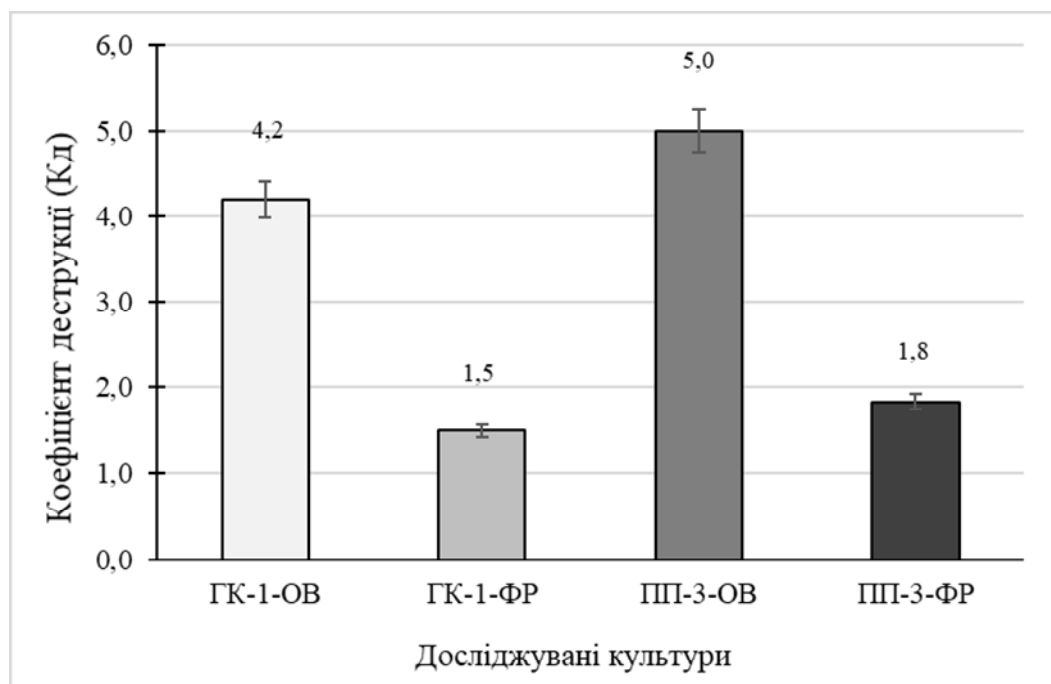


Рис.8. Коефіцієнт деструкції субстрату культурами ГК-1-ОВ, ГК-1-ФР, ПП-3-ОВ та ПП-3-ФР

Непостійний склад харчових відходів (по органічній речовині) ускладнює кількісну оцінку виділення водню в лабораторних умовах і порівняння швидкостей виділення з виділенням водню, наприклад з чистих вуглеводів.

Коефіцієнт деструкції овочевих відходів більший в два рази ніж фруктових відходів. Таку різницю коефіцієнтів деструкції овочів і фруктів можливо пояснити тим, що в овочах міститься більше крохмалю (картопля – до 18 %, морква та буряк – до 3 %), ніж в фруктах (яблуко – до 0,05 %, банан – до 5 %). Вміст крохмалю грає ключову роль в деструкції відходів анаеробними мікроорганізмами, бацили створюють оптимальні умови для швидкого зброджування крохмалю клостридіями, а саме: вони забезпечують анаеробні умови (споживання O_2 , зниження Eh) та гідролізують крохмаль до мономерів, що є субстратом для клостридій [6].

ВИСНОВКИ

1. З різних екосистем виділено три мезофільні воденьутворюючі анаеробні асоціації мікроорганізмів – ГК-1, ГТ-2, ПП-3, які активно синтезували водень за п'ять діб від 5,5 л/кг до 10,5 л/кг.

2. Виявлено, що бактерії у досліджених асоціаціях – грампозитивні, паличкоподібні, різних розмірів, утворюють овальні спори бацилярного або клостридіального типу. За морфолого-культуральними та фізіолого-біохімічними властивостями їх можна віднести до родів *Bacillus sp.* та *Clostridium sp.*

3. З'ясовано, що нейтральне значення рН = 6,8-7,3 та низькі значення Eh = -150...-200 мВ є оптимальними умовами для найбільшого синтезу водню анаеробними мікробними асоціаціями при деструкції харчових відходів.

4. Визначено коефіцієнт деструкції за зброджування харчових відходів виділеними воденьутворюючими анаеробними асоціаціями: для ГК-1-ОВ становило 4,167; ГК-1-ФР – 1,429; ПП-3-ОВ – 5; ПП-3-ФР – 1,832. Найбільший вихід водню спостерігали у асоціації ГК-1-ОВ на овочевих відходах – до 8,8 л/кг за п'ять діб. Найменше – 3 л/кг на фруктових відходах. Коефіцієнт

деструкції та вихід водню на овочевих відходах в 2 рази більше, ніж на фруктових відходах.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Food Waste to Bioenergy via Anaerobic Processes / [Thi Ngoc Bao Dunga et al.] // Energy Procedia. – 2014. – Vol. 61. – P. 307–312.

2. Марков С. А. Получение водорода с помощью микроорганизмов и микробных ТЭ на основе утилизации ингредиентов сточных вод и различных отходов / Марков С. А., Протасов Е. С., Быбин В. А. // Альтернативная энергетика и экология. – 2013. – №118. – С. 108–116.

3. Таширева Г.О. Перспективи створення промислових біотехнологій синтезу біоводню при мікробному зброджуванні багатокomпонентних харчових відходів / Таширева Г.О., Таширев О.Б., Притула І.Р. // Водень в альтернативній енергетиці та новітніх технологіях; за ред. В.В. Скорохода, Ю.М. Солоніна. – К.: «КІМ», 2015. – С. 17–23.

4. Розробка біотехнології отримання молекулярного водню при максимальній деструкції харчових відходів / [Таширев О. Б., Говоруха В.М., Гаврилюк О.А. та ін.] // «Фундаментальні аспекти відновлювано-водневої енергетики і паливно-комірчаних технологій» – К: «КІМ», 2018. – 260 с.

5. Increase in efficiency of hydrogen production by optimization of food waste fermentation parameters / [Novorukha V., Tashyrev O., Tashyрева H. et. al] // Energetika. – 2019. – Т. 65, Nr. 1. – P. 1–10.

6. Образование молекулярного водорода ассоциацией спорообразующих микроорганизмов / Матвеева Н. А. и др. // Мікробіологічний журнал. – 2011. – Т. 73, № 1. – С. 36–43.

7. Притула І.Р. Усовершенствование метода выделения водородобразующих бактерий рода *Clostridium* / Притула І.Р., Таширев А.Б. // Мікробіологічний журнал. – 2012 – Т. 74, № 6. – С. 58 – 64.

8. Таширев О.Б. Біотехнології очищення промислових стічних вод на основі термодинамічного прогнозування взаємодії мікроорганізмів з металами та радіонуклідами: Автореф. дис. ... д-ра техн. Наук. – Київ, 2005. – 33 с

9. Притула І. Р. Застосування редокс-індикаторів для вимірювання окисно-відновного потенціалу під час росту культурмікроорганізмів / Притула І. Р., Таширеві О. Б. // Біологічні студії/Studia Biologica. – 2013. – Т.7, № 3. – С. 133–144.

10. Ястремська Л.С. Загальна мікробіологія і вірусологія : навч. посібник / Л. С. Ястремська, І. М. Малиновська. – К. : НАУ, 2017. – 232 с.

11. Ястремська Л.С. Загальна мікробіологія і вірусологія : лабораторний практикум / уклад. : Л. С. Ястремська, І. М. Малиновська, Н. А. Зінов'єва. – К. : НАУ, 2017. – 120 с.

12. Хоулт Дж. Определитель бактерий Берджи: у 2 т. / Хоулт Дж., Криг Н. – Перевод с английского под редакцией акад. РАН Г. А. Заварзина. – Москва; Издательство "Мир", 1997. – Т.2. – 325 с.

ПОЛУЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОГО ВОДОРОДА МЕЗОФИЛЬНЫМИ АНАЭРОБНЫМИ АССОЦИАЦИЯМИ МИКРООРГАНИЗМОВ ПРИ ДЕСТРУКЦИИ ПИЩЕВЫХ ОТХОДОВ

С.Д. КАЛЬСИНА

Национальный авиационный университет, г. Киев

*Из разных экосистем выделено три мезофильные водородобразующие анаэробные ассоциации микроорганизмов. Выявлено, что по фенотипическим признакам выделенные бактерии можно отнести к родам *Bacillus* sp. и *Clostridium* sp. Исследовано их оптимальные условия культивирования, при которых синтезируется наибольшее количество водорода. Выявлено, что коэффициент деструкции водоородобразующими анаэробными ассоциациями микроорганизмов овощных отходов больше в 2 раза, чем фруктовых отходов.*

Ключевые слова: биогаз, биоводород, анаэробные микроорганизмы, *Bacillus*, *Clostridium*, пищевые отходы.

**PRODUCTION OF MOLECULAR HYDROGEN BY MESOPHILIC
ANAEROBIC MICROBIAL ASSOCIATIONS DURING THE
DESTRUCTION OF FOOD WASTE**

S.D. KALSINA

National Aviation University, Kyiv

Three mesophilic hydrogen-synthesizing anaerobic associations of microorganisms were isolated from different ecosystems. It was revealed that, by phenotypic characters, the isolated bacteria can be attributed to the genera of Bacillus sp. and Clostridium sp. Their optimal cultivation conditions under which the greatest amount of hydrogen is synthesized were investigated. It was revealed that the destruction coefficient by the water-forming anaerobic associations of microorganisms of vegetable waste is 2 times more than fruit waste.

Key words: *biogas, biological hydrogen, anaerobic microorganisms, Bacillus, Clostridium, food waste.*