

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ

**«БЕЛГОРОДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

(Н И У « Б е л Г У »)

ИНСТИТУТ ИНЖЕНЕРНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ И ЕСТЕСТВЕННЫХ НАУК

Кафедра биотехнологии и микробиологии

**ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ МИКРОФЛОРЫ
ПОБОЧНЫХ ПРОДУКТОВ ПРОИЗВОДСТВА БИОГАЗА**

Магистерская диссертация

студентки очной формы обучения
направления подготовки 06.04.01. Биология
магистерская программа Микробиология
2 года обучения группы 07001643
Ткаченко Наталья Николаевна

Научный руководитель

кандидат биологических наук,
профессор кафедры
биотехнологии и микробиологии
Сиротин А. А.

Рецензент

доктор химических наук,
профессор кафедры общей
химии Института биологии и
химии ФГБОУ ВО МПГУ
Телешев А. Т.

БЕЛГОРОД 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.....	9
1.1. Биоэнергетика как основное направление биотехнологии.....	9
1.2. Устройство биогазовой установки и принцип работы.....	10
1.3. Образование биогаза. Технологические стадии процесса.....	20
1.3.1. Первая стадия. Ферментативный гидролиз.....	20
1.3.2. Вторая стадия. Ферментация.....	22
1.3.3. Третья стадия. Анаэробное окисление.....	25
1.3.4. Четвёртая стадия. Образование метана.....	29
1.4. Компоненты, необходимые для жизнедеятельности микроорганизмов.....	31
1.4.1. Источники энергии.....	31
1.4.2. Акцепторы электронов.....	32
1.4.3. Строительные блоки.....	34
1.4.4. Микроэлементы и витамины.....	35
1.5. Факторы, влияющие на микроорганизмы.....	36
1.5.1. Температура.....	36
1.5.2. Аэрация.....	39
1.5.3. Кислотность среды.....	41
1.5.4. Воздействие солей на жизнь и деятельность микроорганизмов.....	42

1.6. Перспективы развития технологии в России.....	43
ГЛАВА 2. ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКАЯ ЧАСТЬ.....	45
2.1. Объект исследования.....	45
2.2. Методы исследования.....	46
2.2.1. Анализ микрофлоры эффлюента методом разбавления	46
2.2.2. Методы микроскопического исследования микроорганизмов.....	50
2.2.3. Методы исследования биологической активности.....	51
2.2.3.1. Метод сахаролитической активности микроорганизмов....	52
2.2.3.2. Метод определения протеолитической активности микроорганизмов.....	54
2.2.4. Метод определения микроорганизмов до вида.....	55
2.2.5. Статистическая обработка цифровых данных.....	58
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	61
3.1. Групповой анализ микрофлоры побочного продукта производства биогаза. Численность микроорганизмов, выросших на питательных средах.....	61
3.2. Микроскопическое исследование микрофлоры эффлюента.....	63
3.3. Статистическая обработка цифровых данных.....	67
3.3.1. Обработка цифровых данных методом дисперсионного анализа.....	67
3.3.2. Обработка цифровых данных разностным методом.....	71

3.4. Видовое определение микроорганизмов выделенных в чистую культуру.....	78
3.5. Сравнение интенсивности протекания качественной реакции....	79
3.5.1. Данные полученные в ходе проведения реакции на сахаролитическую активность.....	79
3.5.2. Данные полученные в ходе проведения реакции на протеолитическую активность.....	82
3.5.3. Данные полученные в ходе проведения реакции на каталазную активность.....	83
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	85
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	88

ВВЕДЕНИЕ

Применение в сельском хозяйстве, в частности животноводстве, технологий интенсифицирующих их производительность, неминуемо привело к образованию и накоплению большого количества различных отходов. На сегодняшний день в нашей стране в зонах интенсивного развития аграрной промышленности, активно внедряются новейшие системы контролируемой переработки отходов - биогазовые станции. (2,3,9)

Современные технологии открывают широкий спектр возможностей переработки в биогаз практически любых видов органического сырья. Наиболее эффективно использование биогазовых технологий для переработки отходов животноводческих и птицеводческих ферм, очистки сточных вод, поскольку характеризуется постоянством потока поступающих отходов, а также простотой их сбора. В этих условиях рентабельно строить биогазовые станции вблизи агропромышленных комплексов. Системный подход в производственной деятельности, когда отходы перерабатываются по технологической цепочке и становятся началом следующего этапа, позволяют минимизировать урон от выброса загрязняющих веществ в окружающую природную среду. (2,19,25)

Обычно под биогазовой станцией понимают систему инженерных сооружений, состоящую из устройств по подготовке сырья, производств биогаза и удобрений, очистки и хранения биогаза, производства электроэнергии и тепла, а также автоматизированной системы управления процессами.(2,21)

Так, в процессе анаэробной переработки сырья животноводческих ферм, в метантенках биогазовых станций образуется горючий газ, состоящий на 60% из метана, и твердый осадок, содержащий в себе практически весь азот и другие питательные вещества, входящие в состав исходного материала. Активный обмен веществ и довольно высокая скорость

биохимических обменных реакций в метантенке, достигается за счет поддержания и постоянного обновления величин граничных поверхностей обрабатываемого сырья. (8,16,22)

Одним из достоинств биогазовой технологии, в условиях анаэробной переработки отходов, является обеззараживание твердой фракции – побочного продукта технологии, используемой впоследствии в качестве удобрения, от патогенной микрофлоры и гельминтов. Такие удобрения (далее эффлюент) улучшают оборот макро- и микроэлементов в системе почва-растение, стимулируют деятельность почвенных организмов, вносят вклад в увеличение проницательной способности и гигроскопичности почв, предотвращают их эрозию. (16,21)

Органические вещества, содержащиеся в эффлюенте, являются базой для развития микроорганизмов. Микрофлора твердого остатка складывается преимущественно из микрофлоры желудочно-кишечного тракта животных и внешней среды. (10,30)

Актуальность темы обусловлена отсутствием данных, полученных на основе дифференциальных методик, по результатам которых можно получить представление о видовом составе населяющих субстрат микроорганизмов, что в свою очередь не позволяет контролировать продуктивность работы биогазовой станции.

В рамках работы Международной лаборатории, с которой активно сотрудничает кафедра биотехнологии и микробиологии Института инженерных технологии и микробиологии НИУ «БелГУ», для решения проблем совершенствования технологического процесса выработки биогаза и повышения эффективности работы первой российской промышленной биогазовой станции «Лучки» организованы следующие направления совместных научно-исследовательских работ:

- определение видового и родового состава микрофлоры процесса метаногенеза, соотношение бактерий на каждом технологическом этапе выработки биогаза;

- определение микро- и макроэлементного состава субстрата, анализ промежуточных продуктов метаболизма микроорганизмов на различных стадиях биогазового процесса при различных видах исходного сырья для последующей оценки эффективности процесса метаногенеза на каждом этапе;

- определение параметров среды, влияющих на протекание процесса выработки биогаза и жизнедеятельность различных видов микроорганизмов; поиск и дальнейшее культивирование штаммов микроорганизмов, устойчивых к различным экстремальным условиям.

Выбор данных направлений работы кафедры обусловлен в том числе активной работой правительства Белгородской области в области экологического законодательства, которое постановлением от 30 октября 2010 г. №364-пп утвердило долгосрочную целевую программу «Энергосбережение и повышение энергетической эффективности белгородской области на 2010-2015 годы и целевые показатели на период до 2020 года», один из приоритетов программы – развитие энергетики на базе возобновляемых источников – биогазовой технологии.

Одним из целевых направлений, имеющих огромное значение для промышленного и экологического развития России, является проект, связанный с решением задач по использованию отходов переработки всех видов веществ растительного и животного происхождения, а так же продуктов жизнедеятельности организмов и органических отходов, при получении эффективных экологически безопасных органических удобрений и биогаза.

В настоящей магистерской диссертации впервые был адаптирован метод исследования ферментативной активности для исследования видового состава макрофлоры на биогазовой станции «Лучки».

Практическая значимость и интерес работы не вызывают сомнения, поскольку на основе материалов данного исследования возможно приступить к разработке практических рекомендаций по корректировке видового состава

«переработчиков», либо соотношения компонентов субстрата с целью повышения продуктивности биогазовой установки. Кроме того, результаты исследования можно использовать в разработке методических пособий по направлениям подготовки «биотехнология» и «микробиология». Считаем, что данное исследование является весьма актуальным и значимым в области биотехнологии.

Таким образом, целью данного исследования стала оценка активности микроорганизмов на стадии дображивания субстрата при производстве биогаза и выявление продуктивных видов бактерий.

В качестве объекта исследования был взят образец эффлюента, сразу после процесса сепарации «Дображиватель», предметом стал количественный и качественный состав активной микрофлоры взятого нами образца.

В связи с этим решались следующие задачи:

- 1) Определить микроорганизмы населяющие субстрат;
- 2) Изучить признаки полученных видов;
- 3) Выявить продуктивность ферментативной активность бактерий;
- 4) Оценить перспективы использования повышенной концентрации исследуемых видов микроорганизмов.

Магистерская диссертация по традиции состоит из введения, литературного обзора, экспериментальной части, обсуждения результатов и выводов.

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 Биоэнергетика как основное направление биотехнологии

Истоки биоэнергетики как науки можно обнаружить ещё в рассуждениях древних о природе брожения и главенствующей роли воздуха при использовании пищи живыми организмами, замечают учёные. Так, Леонардо да Винчи сравнил питание животных с горением свечи, а его идея была взята на вооружение и развита в опытах с растениями Я. Б. Гельмонтом.

Первые фундаментальные исследования в области биоэнергетики были проведены Ю. Р. Майером (1842), который в результате изучения энергетических процессов в организме человека сформулировал первое начало термодинамики. Научный интерес в этой области начал прирастать открытиями — большой вклад в понимание механизмов клеточной биоэнергетики внесли О. Г. Варбург, американский биохимик А. Ленинджер и П. Митчелл. А уже термин «биоэнергетика» был предложен несколько позже А. Сентом-Дьёрдьи в 1956 году и получил официальное признание научного сообщества в 1968 году. В то же время ученые пришли к пониманию того, что превращения энергии в живых системах подчиняются законам термодинамики, а живые организмы являются открытыми системами, которые постоянно обмениваются с внешней средой веществом, энергией и информацией.(20,21,59)

Таким образом, под понятием биоэнергетики (биологической энергетики) понимают совокупность процессов преобразования энергии, поступающей извне, в биологически полезную работу живых систем, а также раздел биологии, изучающий эти процессы.

В настоящее время, биоэнергетика играет в жизни общества особую роль, поскольку как за рубежом, так и в России, люди на всех уровнях обеспокоены экологической обстановкой и проблемами накопления отходов (органическая часть которых составляет до 60%), что в свою очередь говорит о том, что пути решения этих проблем должны быть технологичны и своевременны. (59,60,62)

С каждым годом технологии переработки отходов животноводческого производства, и таким образом получения альтернативных способов энергии, набирают обороты. В качестве альтернативы размещения отходов на полигонах, пришёл метод биологической обработки – анаэробного брожения и компостирования. (25)

По данным, предоставленным компанией ОАО «Белгородский институт альтернативной энергетики», за 2013 год на территории Белгородской области только одной биогазовой станцией «Лучки» было переработано 73,4 тысячи тонн сырья (из которых 31 тысяча тонн свиноводческих стоков, 14,6 тысяч тонн отходов мясoperеработки). Работа этой биогазовой станции за тот же 2013 год дала одних только органических биоудобрений 66,8 тысяч м³, выработано электроэнергии 19,6 миллионов кВт/ч, а тепловой – 18,2 тысячи Гкал при установленной мощности 2,4 МВт.

Несомненно, данная биогазовая станция вносит ощутимый вклад в улучшение биосферы Белгородской области. (65)

1.2 Устройство биогазовой установки и принцип работы

Человечество научилось использовать биогаз достаточно давно. Уже в первом тысячелетии до н.э. на территории современной Германии существовали примитивные биогазовые установки.

Первая задокументированная биогазовая установка была построена в Индии в 1859 году. Также известно, что в 1895 году биогаз уже применялся в Великобритании для уличного освещения. В 1930 году, с развитием микробиологии, были обнаружены бактерии, участвующие в процессе производства целевого продукта переработки органических отходов. (1)

Современные биогазовые установки представляют собой строительные объекты, состоящие из герметичных реакторов оснащенных комплексом систем подачи сырья, подогрева, перемешивания, канализации, воздушной газовой и электрической.

Типичное устройство добротной биогазовой станции состоит из следующих элементов: ёмкость гомогенизации, загрузчик твердого (жидкого) сырья, реактор, мешалки, газгольдер, система смешивания воды и отопления, газовая система, насосная станция, сепаратор, приборы контроля, кипи с визуализацией, система безопасности (как показано на рис. 1.2.1).

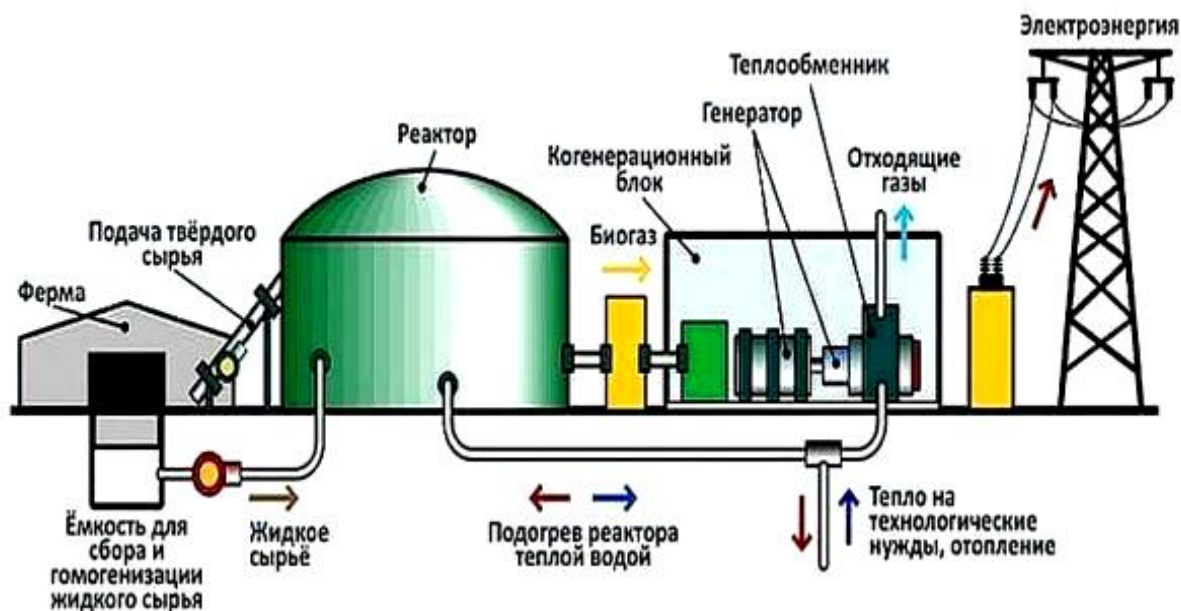


Рис. 1.2.1. Устройство биогазовой станции (66)

Реакторы (метантенки) обычно выполняются из монолитного железобетона или стали с покрытием. Конструкция закрытая и может быть

модульной. Диаметр реактора составляет 24 м и высотой 6 м. Как правило, при увеличении мощности увеличивается и количество реакторов.

Жидкие биоотходы перекачиваются на биогазовую установку фекальными насосами по трубопроводу. Они попадают в предварительную емкость, где происходит перемешивание массы, разбавление до необходимой влажности и подогрев до необходимой температуры.

Сборку биогазового реактора осуществляют из панелей, выполненных из стали с высококачественным покрытием по технологии высокотемпературного спекания. Это покрытие является долговечным, стойким к химическим воздействиям, коррозии и ударопрочным. Конструкция предусматривает быструю сборку и разборку. Преимущество биогазовых реакторов из стали с покрытием по сравнению с бетонными состоит в долговечности, отсутствии необходимости в опалубке, сокращении сроков, возможности круглогодичного строительства. Люки из нержавеющей стали, усиленные вырезы под мешалки, смотровые окна — все рассчитано с учетом особенностей биогазовой технологии. Важным преимуществом металлического реактора по сравнению с железобетонным является то, что он легко демонтируется.

Силос или другое твердое сырье подается непосредственно в биогазовый реактор шнековым загрузчиком (рис.1.2.2). Бункер укомплектовывается двумя турбошнеками, которые имеют систему плавного пуска, благодаря чему происходит экономия электроэнергии и гарантируется надежная работа привода в течение 24 часов в день.

Особо прочная конструкция из легированной стали со стойким к кислотному воздействию покрытием позволяет агрегатам работать при больших нагрузках. Использование специальных скребков с регулируемыми ножами увеличивает производительность. Привод с надежными планетарными редукторами гарантирует стабильность работы при максимальных нагрузках и вращающих моментах, а гидравлическое управление заслонкой обеспечивает очистку турбошнека и транспортера.



*Рис. 1.2.2. Шнековый загрузчик биогазовой станции «Лучки»,
Белгородская область. (67)*

Наклонные мешалки (рис. 1.2.3) разработаны специально для работы в агрессивных условиях внутри биогазового реактора. Винты изготовлены при помощи специального оборудования, которое обеспечивает миллиметровую точность в наклоне лопастей. Мешалка с электрическим приводом разработана для работы во взрывоопасной среде класса 1 и класса 2. Все детали мешалки, включая изоляционную мембрану для трубки привода защищены от ультрафиолетового излучения. Винтовая мешалка монтируется с внешней стороны стены ферментатора. Мешалка поддерживается при помощи двух верхних реек либо опционально на реечной передаче, что позволяет устанавливать любой угол наклона. Карданный вал, винт, и пластина изготовлены из нержавеющей стали.



Рис.1.2.3. Наклонная мешалка для биогазовой установки (68)

Погружные мешалки (рис. 1.2.4) биогазовых станций с электрическим приводом сконструированы для работы во взрывоопасной и одновременно агрессивной среде. Мешалка устанавливается на мачту с помощью крепления двигателя для регулировки высоты устройства.



Рис. 1.2.4. Вид погружной мешалки для биогазовой установки (68)

Благодаря роликовым направляющим мешалка может плавно погружаться и подниматься без трения, даже если кабель тянется под небольшим углом. Мотор-редуктор изготовлен из чугуна с шаровидным графитом и сверху окрашен. Винт оцинкован, а крепление двигателя изготовлено из нержавеющей стали. Погружная мешалка выполнена в виде водонепроницаемого моноблока, приводящего в движение трехлопастной винт.

Внутри биогазового реактора поддерживается фиксированная для микроорганизмов температура. Температура в реакторе мезофильная около $+37^{\circ}\text{C}$. Подогрев реактора ведется теплоносителем. Температура теплоносителя на входе в реактор $+80^{\circ}\text{C}$. Температура носителя после реактора около $+55^{\circ}\text{C}$.

Система подогрева — это котлы, насосы, теплообменники, гребенки. Сеть трубок для подогрева находится внутри стенки реактора, либо на ее внутренней поверхности. Если биогазовая установка комплектуется когенерационной установкой, то теплоноситель от охлаждения генератора используется для подогрева реактора. Источниками теплоснабжения сооружений биогазовой установки могут быть газовые котлы, которые работают на биогазе, на природном газе и на смеси, а также электрические котлы.

Неотъемлемой частью конструкции является газгольдер — хранилище биогаза (рис.1.2.5). Он герметично крепится сверху реактора.



Рис.1.2.5. Газгольдеры биогазовой станции «Лучки», Белгородская область

Система газгольдера имеет двухслойную конструкцию. Внешний купол-чехол имеет стойкость к ультрафиолетовому излучению и атмосферным осадкам. Внутренний купол натягивается под действием вырабатываемого биогаза.

Между внешним и внутренним куполами закачивается воздух для создания давления на нижний купол, а также для придания формы внешнему. Давление биогаза внутри газгольдера составляет от 200 до 500 Па. Запас газгольдера на 2-3 часа хранения биогаза. Материал газгольдера устойчив к поджогу электропроводами под напряжением, фейерверками, а также к прорыву металлическими стержнями, даже раскаленными докрасна. Подача биогаза в газгольдер осуществляется через специальные патрубки, оснащенные предохранительными клапанами во избежание переполнения.

Сепаратор (рис. 1.2.6) предназначен для разделения переброженной массы на твердую и жидкую фракции и входит в базовую комплектацию установки получения биогаза. Детали сепаратора выполнены из коррозионно- и износостойкой стали.



Рис.1.2.6. Сепаратор биогазовой установки (68)

Смесь поступает произвольно или подается при помощи насоса через патрубок подачи смеси в загрузочную камеру. Из загрузочной камеры с помощью шнека переменного шага, выполненного из износостойкой стали, смесь подается в камеру сепарирования. Камера сепарирования представляет

собой цилиндрическое сито, также выполненное из износостойкой стали. В камере сепарирования посредством отжима происходит разделение жидкой и твердой фракций. Жидкая фракция сливается через сливной парубок в накопительный резервуар. Твердая фракция через разгрузочное устройство покидает сепаратор и скапливается в накопительном контейнере.

Факельная установка (рис. 1.2.7) предназначена для временного или периодического полного сжигания биогаза, вырабатываемого биогазовыми установками при отсутствии возможности его полезного использования в качестве энергоносителя.



Рис. 1.2.7. Вид факельной установки биогазовой станции (68)

Сжигающая система состоит из горелки и дополнительных узлов. Горелка сконструирована по принципу инжекционного сжигания и состоит из сопла, инжектора с системой контроля подачи воздуха, трубы защиты пламени, штуцера и системы управления горелкой. Система сжигания биогаза сделана из нержавеющей стали. Несущая конструкция держит горелку и вертикально установленный штуцер. Система управления горелки установлена в шкафу, который монтируется на несущей конструкции системы сжигания, и содержит все элементы для контроля и управления зажиганием и пламенем.

Производство электрической и тепловой энергии в установках на базе двигателя внутреннего сгорания (рис.1.2.8) — наиболее распространённый способ извлечения выгоды от биогазовой станции.



Рис. 1.2.8. Генератор электрической энергии биогазовой станции «Лучки», Белгородская область (67)

Электроэнергия может круглогодично использоваться как собственных нужд, так и для подачи в сеть по нерегулируемому или зеленому тарифу. Из 1 м³ биогаза вырабатывается одновременно 2,4 кВтч электрической +2,5 кВтч тепловой энергии. (68)

Газ сгорает, двигатель работает, вращая генератор. Ежедневно станция вырабатывает около 56 000 киловатт-часов, чего достаточно для обеспечения электроэнергией всего Прохоровского района. Энергия отдаётся в общую электросеть. Помимо электричества станция ежегодно вырабатывает 27,3 тысяч гигакалорий тепловой энергии. (67)

Система очистки позволяет производить очистку (обогащение) биогаза до состояния биометана. Биометан — полный аналог гостовского природного газа с концентрацией метана в пределах 95-99%. После системы очистки газ может использоваться как моторное топливо для заправки автомобилей, может подаваться в общую систему газоснабжения в трубу среднего или

низкого давления или использоваться на технологические нужды для полной замены природного газа.

Предлагается регенеративная водяная система обогащения биогаза. Ее принцип работы основан на различной растворимости газов в жидкости. При пропускании биогаза через холодную воду углекислый газ растворяется в ней, а при нагреве высвобождается. Преимуществом водяной системы обогащения биогаза по сравнению с PSA или угольными системами абсорбции является низкая себестоимость очистки газа. Благодаря использованию воды как основного компонента данного процесса для процесса не требуется никаких реагентов.

Сушка биоудобрений (рис. 1.2.9) позволяет более полно использовать потенциал биогазовой станции и в разы повысить ее рентабельность.



Рис.1.2.9. контейнер с просушенным биоудобрением на станции «Лучки». Процесс контролирует главный инженер Илья Константинович Мейлах. (67)

Сушеные биоудобрения имеют более высокую продажную цену по сравнению с просто отсепарированной биомассой. В сушеном гранулированном виде удобрения могут с низкими затратами транспортироваться на любые расстояния и храниться достаточно долго. Два

побочных продукта биогазовой станции- тепло и сырые биоудобрения могут быть задействованы для производства востребованного продукта.

Сушилка работает по высокоэффективному методу для сушки биомассы с помощью низкой температуры. Малый уровень выбросов и высококачественный конечный продукт, при низком уровне потребления являются преимуществом технологии. Регулировка скорости подачи продукта гарантирует постоянную влажность обсушиваемого продукта и оптимальное использование дополнительной тепловой энергии. (68)

1.3 Образование биогаза. Технологические стадии процесса

Биометаногенез представляет собой сложный микробиологический процесс, в ходе которого органическое вещество разлагается до диоксида углерода и метана в анаэробных условиях. Практически все соединения природного происхождения, а также значительная часть ксенобиотиков органической природы, способны подвергаться микробиологическому анаэробному разложению. (6,7,12)

1.3.1 Первая стадия. Ферментативный гидролиз

Гидролиз является первым этапом в процессе разложения. На этом этапе, сахара, жиры и белки преобразуются в меньшие органические соединения, такие как аминокислоты, простые сахара, жирные кислоты, и некоторые спирты.(24)

Этот этап очень важен, поскольку большие органические молекулы, попросту слишком велики, чтобы быть непосредственно поглощаемыми и могли использоваться микроорганизмами в качестве источника пищи.

Для достижения биодegradации, некоторые микроорганизмы выделяют различные типы ферментов (энзимов), называемых внеклеточными ферментами, которые «разрезают» крупные молекулы на меньшие части, чтобы микроорганизм мог затем принимать эти части внутрь клетки и использовать их в качестве источника энергии и питательных веществ. (5,6)

Некоторые микроорганизмы выделяют несколько различных ферментов, которые позволяют им расщепить клеточную стенку растительного сырья в субстрате. Другие микроорганизмы выделяют ферменты, которые расщепляют сахара или белки.

Микроорганизмы, способные расщепить различные сахара называются сахаролитическими, а расщепляющие белки - протеолитическими.

Существуют различные ферменты для деструкции сахаров, белков, жиров. В таблице 1.3.1.1 приведены примеры некоторых различных групп внеклеточных ферментов. Каждая группа содержит несколько ферментов, которые специализируются на различном сырье, таком как различные белки. Скорость разложения при стадии гидролиза сильно зависит от природы сырья. Так, разложение целлюлозы и гемицеллюлоз обычно происходит медленнее, чем разложение белков. (6,16,17)

Таблица 1.3.1.1

Наиболее важные группы гидролитических ферментов и их функции.(12)

Ферменты	Субстрат	Продукты распада
Протеиназа	Белки	Аминокислоты
Целлюлаза	Целлюлоза	Сахара, такие как глюкоза, ксилоза,

		манноза и арабиноза
Амилаза	Крахмал	Глюкоза
Липаза	Жиры	Жирные кислоты и глицерин
Пектиназа	Пектин	Сахара, такие как галактоза, арабиноза и сложные молочные уоновые кислоты

1.3.2 Вторая стадия. Ферментация

Стадия ферментации, как и стадия гидролиза, состоит не из одной, а из нескольких реакции. Какие точно проходят реакции, зависит от того, какими организмами они осуществляются, и какой субстрат перерабатывается в ходе процесса.(33)

В процессе фазы ферментации активность проявляет большое количество организмов, даже большее, чем при других фазах. Многие из организмов, проводящих ферментацию, являются теми же, что осуществляют гидролиз в течение первого этапа (23); а в процессе ферментации активны микроорганизмы и других видов, такие как, например, *Enterobacterium sp*, *Bacteroides*, *Acetobacter* и *Eubacterium*.

Во время ферментации продукты гидролиза (источники углерода и энергии) используются в качестве сырья рядом различных микроорганизмов.

Сахара, аминокислоты, спирты и т.д. могут быть использованы в качестве сырья микроорганизмами. (33,40)

С другой стороны, ферментативные микроорганизмы не используют жирные кислоты, полученные при расщеплении жиров и ароматических

структур, так как они не разрушаются до следующего этапа в цепи разложения (анаэробного окисления). (13)

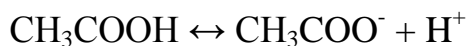
Путем различных ферментационных реакций, продукты гидролиза преобразуются. Главным образом, образуются различные органические кислоты (уксусная, пропионовая, масляная, янтарная, молочную и т.д.), спирты, аммиак (из аминокислот), а так же диоксид углерода и водород. (8,10)

На то, какие именно соединения будут образовываться, влияет источник (субстрата) и природа процесса, а также то, какие организмы присутствуют в процессе ферментации. Типичным для образовавшихся кислот является то, что заряженная форма (без протонов) находится в равновесии с незаряженной формой (с протонами, уравнение 1).

Кислотная постоянная (рКа) показывает, как легко кислоты выпускают свой протон. Если рН ниже значения рКа, то большинство кислот находится в незаряженной форме, в то время как при рН выше значения рКа кислоты в основном находятся в заряженном виде.

В биогазовом процессе при $pH > 7$, кислоты в основном находятся в заряженной форме (анион). На этом этапе, они имеют тенденцию образовывать соли с различными металлами, такими как натрий и калий. (8,13)

Форма кислоты и анион имеют разные названия (например, уксусная кислота и ацетат) (анион, таблица 1.3.2.1).



Уравнение 1. Уксусная кислота в равновесии со своей анионной формой, ацетатом. (7)

Таблица 1.3.2.1

Названия некоторых распространенных кислот и значения рКа для них. Значения относятся к водным растворам при 25 ° С. (12)

Общее	Систематическое	Анион	рКа	Химическая структура
-------	-----------------	-------	-----	----------------------

название	название			(кислотная форма)
Муравьиная кислота	Метаноик кислота	Соль муравьиной кислоты (формат)	3,77	HCOOH
Уксусная кислота	Этаноловая кислота	Ацетат	4,76	CH ₃ COOH
Пропионовая кислота	Пропановая кислота	Пропионат	4,80	CH ₃ CH ₂ COOH
Масляная кислота	Бутановая кислоты	Бутират	4,83	CH ₃ CH ₂ CH ₂ COOH
Валериановая кислота	Пентановая кислота	Валериат	4,84	CH ₃ CH ₂ CH ₂ CH ₂ COOH
Каприловая кислота	Капроновая кислота	Капронат	4,85	CH ₃ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ COOH

Продукты ферментации одного и того же соединения могут быть различными в различных организмах. Даже организмы одного рода или вида могут образовывать различные продукты из одного и того же соединения (табл. 1.3.2.2.). В некоторых случаях, один и тот же организм может также изменить свой ферментационный характер, в зависимости от преобладающих условий (наличия других организмов, факторов окружающей среды).

Для организма, производящего продукты ферментации, они являются отходами, которые не могут быть им в дальнейшем использованы. Вместо этого, они служат в качестве субстрата для других микроорганизмов в биогазовом процессе, включая другие ферментационные микроорганизмы, которые в дальнейшем разлагают эти продукты. (7)

Таблица 1.3.2.2

Продукты ферментации глюкозы, образованные двумя различными видами бактерий соответствующего рода Клостридиума.

Продукты	Клостридиум бутиликум	Клостридиум ацетобутиликум
Масляная кислота	76	4
Уксусная кислота	42	14
Молочная кислота	-	-
CO ₂	188	221
H ₂	235	135
Этанол	-	7
Бутанол	-	56
Ацетон	-	22

Цифры представляют собой количество образованных моль на 100 моль глюкозы.(12)

1.3.3 Третья стадия. Анаэробное окисление

Продукты, образующиеся в процессе ферментации, далее расщепляются в процессе разнообразных анаэробных окислительных реакций. Это является важнейшим условием в процессе выработки биогаза, который требует тесного сотрудничества между организмами. Они осуществляют окисление совместно с метанобразующими организмами, которые принимают активное участие в следующем этапе, фактическом образовании метана.

Причина того, что две различные группы организмов должны работать вместе, очень сложна, но вкратце можно сказать, что это явление, тесно связано с концентрацией газообразного водорода. (25,41)

Во время анаэробного окисления, протоны используются в качестве окончательных акцепторов электронов, и это приводит к выделению газообразного водорода.

По термодинамическим причинам, образование газообразного водорода будет иметь место только в случае, если концентрация водорода постоянно поддерживается на очень низком уровне. (40)

Если образованный газообразный водород, не будет непрерывно удаляться, процесс анаэробного окисления остановится, потому что микроорганизмы больше не получают достаточно энергии для роста (см. рис. 1.3.3.1)



Рис. 1.3.3.1. Содержание водорода в газообразной форме для анаэробного окисления пропионата в газообразный водород и ацетат (сплошная линия) и для образования метана из водорода (пунктир кривой линией). (12)

На рисунке изображена зона, в которой происходит метанообразование. В ходе этого процесса постоянно поглощает водород, при этом сохраняется его концентрация на достаточно низком уровне.

В биологических системах, отличных от биогазового процесса, существуют и другие микроорганизмы, поглощающие газообразный водород, которые могут проводить анаэробное окисление, например, это сульфаторедуцирующие или нитраторедуцирующие микроорганизмы. (49,55,56)

Согласно литературным данным, такое сотрудничество между микроорганизмами называют синтрофным, а передача газообразного водорода - "межвидовым переносом водорода" (ИНТ), то есть передачей водорода между видами микроорганизмов.

Горизонтальная линия показывает уровень, на котором организмы получают энергию для роста. Только в том случае, когда давление газообразного водорода находится на таком уровне, что наклонная линия проходит выше этой горизонтальной прямой, организм получает достаточно энергии для роста. (57,61,62)

Для пропионатоокисляющих микроорганизмов это означает, что предпочтительней иметь низкое давление газообразного водорода, а для метаногенов, наоборот. Метаногены лучше растут при высоком давлении водорода. Заштрихованный треугольник в середине рисунка 5 показывает область концентрации газообразного водорода, при которой оба вида организмов могут расти в одно и то же время. (46,47)

Стоит отметить, что водород может формироваться по-разному, и не все организмы, вырабатывающие газообразный водород зависят от организмов-партнеров и межвидового переноса водорода. Несколько ферментативных организмов вырабатывают газообразный водород даже в отсутствие водородопоглощающих организмов, но в значительно более низких концентрациях.

Многие синтрофы, которые образуют газообразный водород, могут также использовать альтернативные пути разложения, в отсутствие метаногена-партнера поглощающего водород, при таких путях разложения газообразный водород образовываться не будет. Они могут впоследствии адаптироваться к преобладающим концентрациям водорода.

Другие ферментирующие микроорганизмы всегда образуют газообразный водород, и в этом случае они абсолютно зависят от организмов, поглощающих газообразный водород. (57,58)

Как правило, организмы, которые могут переключать свой метаболизм, когда они не могут образовывать газообразный водород, вместо этого производят больше различных типов жирных кислот и спиртов. Субстраты для анаэробного окисления состоят из различных жирных кислот, спиртов, некоторых аминокислот и ароматических углеводов.

Ароматические углеводороды представляют собой соединения с кольцевыми структурами, такими как бензойная кислота, фенолы или некоторые аминокислоты, которые возникают, например, в растительных материалах и свином навозе. Жирные кислоты и спирты являются продуктами различных гидролизных и ферментационных реакций. Кроме газообразного водорода, эти соединения в первую очередь образуют ацетат и двуокись углерода во время анаэробного окисления.

Syntrophus, *Clostridium* – примеры родов бактерий, в которых есть многочисленные организмы, которые могут производить различные анаэробные окисления и синхронно работать с организмами, которые используют производимый ими газообразный водород. Многие из таких организмов известны как ацетогены, то есть в дополнение к производству газообразного водорода и диоксида углерода, они также образуют в качестве основного продукта ацетат. (6)

1.3.4 Четвёртая стадия. Образование метана.

Метаногенез является заключительным этапом биогазового процесса. На этом этапе различными метаногенными микроорганизмами образуются метан и диоксид углерода (биогаз). Наиболее важными веществами в жизненном цикле для таких организмов являются: газообразный водород, диоксид углерода и ацетат, которые образуются в процессе анаэробного окисления. Однако другие вещества, такие как метиламины, некоторые спирты и форматы также могут быть использованы метаногенами.(44,45)

Как и в других стадиях биогазового процесса, сразу несколько различных видов микроорганизмов принимают активное участие на этом этапе. Метанобразующая группа, которая обычно преобладает в биогазовом процессе, использует в качестве субстрата ацетат, также называется ацетотрофическими метаногенами,

В их метаболизме ацетат расщепляется на две составные части. Один из атомов углерода используется для формирования метана, а другой для образования диоксида углерода. Таким образом, ацетотрофические метаногены иногда также называются ацетаторасщепляющими метаногенами. Известно, что ацетат является источником около 70% биогаза, получаемого в ферментаторе. (32,39,44,47,48)

Гидрогенотрофы являются еще одной важной группой метаногенов, для которой первичным субстратом для образования метана являются газообразный водород и диоксид углерода.

На сегодняшний день известны только две группы метаногенов, которые расщепляют ацетат: Метаносаета и Метаносарциза, в то время как существует много различных групп метаногенов, которые используют

газообразный водород для производства метана, в том числе Метанобактериум, Метанококкус, Метаногениум и Метанобревибактеры.

Метаносаета и Метаносарциза имеют различные темпы роста, а также отличаются по своей способности утилизировать ацетат. Метаносарциза растет быстрее, но ей трудно использовать ацетат при его низких концентрациях, когда Метаносаета имеет преимущество.

Однако присутствие этих организмов зависит не только от концентрации ацетата, но и от таких факторов, как частота загрузки и смешивание.

Таблица 1.3.4.1.

Время удваивания и самая низкая допустимая концентрация ацетата для Метаносарцизы и Метаносаеты.(12)

Метаногены	Время удваивания	Самая низкая допустимая концентрация ацетата
Метаносарциза	1 день	~ 20 мг / л
Метаносаета	2-12 дней	~ 4 мг / л

Поскольку метаногены как правило, растут очень медленно, метанообразование часто является лимитирующим этапом биогазового процесса. Генерационное время, т.е. время, необходимое для микроорганизма чтобы разделить себя на две части, для метаногенов составляет от 1 до 12 дней.

Метаносаета растет медленнее всего. Темпы роста метаногенов часто устанавливают предел, насколько коротким может быть время удерживания в непрерывном биогазовом процессе. Слишком малое время удерживания (менее 12 дней) увеличивает риск того, что эти организмы будут вымываться из процесса, потому что они не имеют достаточно времени, чтобы увеличиваться с той же скоростью, с какой материал закачивается и выкачивается из ферментатора. (48,49)

Метаногены отличаются от других организмов в биогазовом процессе, потому что они не являются обычными бактериями. Метаногены являются частью группы организмов называющихся Архея. Археи являются отдельной группы организмов, которые развивались параллельно с бактериями (прокариотами) и грибами (эукариотами).

Из-за своей уникальной природы, метаногенов легко отличить от других «обычных» бактерии в микроскоп. Метаногены содержат соединение (F420), которое позволяет им светиться зелено-голубым цветом при освещении в диапазоне длин волн около 350-420 нанометров. (46,47)

Тот факт, что метаногены не похожи на другие организмы также означает, что они не так надежны, как многие другие микробы в процессе. Метаногены очень отзывчивы на всякого рода изменения внешней среды, такие как изменения рН или наличие токсичных соединений, присутствие тяжелых металлов или наличие органических загрязнителей. Поскольку эти организмы имеют большее значение для прохождения анаэробного окисления, ингибирование/нарушение метаногенов может серьезно повлиять на весь процесс. (57,58,59)

1.4 Компоненты, необходимые для жизнедеятельности микроорганизмов

1.4.1 Источники энергии

Источник энергии является материалом, который микроорганизмы используют для получения энергии для их роста и жизнедеятельности, такой как движение или потребление субстрата.

Источником энергии для микроорганизмов может быть химическое соединение или солнечная энергия. (26,27)

Организмы в процессе выработки биогаза используют различные химические соединения в качестве источников энергии. Это могут быть как неорганические соединения, такие как водород, так и органические соединения: различные виды сахаров, жиров и белков.

Когда организмы используют химические соединения, в качестве источника энергии, под их воздействием происходит окисление. В ходе этой реакции электроны/протоны переносятся через несколько так называемых промежуточных носителей до конечного акцептора электронов и, в процессе этого перехода, происходит образование энергии.(51-54)

Вид энергии, используемый микроорганизмами, часто является химическим соединением аденозинтрифосфатом. Аденозинтрифосфат (сокр. АТФ) является нуклеотидом, и играет исключительно важную роль в обмене энергии и веществ в организмах. В первую очередь это соединение известно как универсальный источник энергии для всех биохимических процессов, протекающих в живых системах.(61,63)

1.4.2 Акцепторы электронов

Кислород является окончательным акцептором электронов (иногда называемый электронным приемником) в аэробном брожении (дыхании кислородом). В отсутствие кислорода, имеет место ферментация или так называемое анаэробное (бескислородное) окисление. Конечными сформированными продуктами окисления в основном являются различные кислоты и спирты, а также водород и диоксид углерода. (рис. 1.4.2.1)

Анаэробное окисление в основном использует неорганические соединения в качестве акцепторов электронов.(26,51)

Вещества, которые могут быть использованы для анаэробного окисления, включают в себя, например, сульфаты (SO_4^{2-}), железо (Fe^{3+}), марганец (Mn^{4+}), нитраты (NO_3^-) и диоксид углерода (CO_2).

Некоторые микроорганизмы могут использовать только один тип акцепторов, в то время как другие могут использовать несколько различных типов.

Некоторые акцепторы электронов более выгодны, чем другие, поскольку они обеспечивают формирование большего количества энергии, в следующем порядке: $\text{O}_2 > \text{Mn}^{4+} > \text{NO}_3^- > \text{Fe}^{3+} > \text{SO}_4^{2-} > \text{CO}_2$, где кислород (O_2) обеспечивает самое большое количество энергии и двуокись углерода (CO_2) наименьшее.

Если несколько акцепторов электронов доступны в одном процессе, будут доминировать организмы, которые используют самые энергогенерирующие соединения.(53,54,61,62)

Ярким примером этого может служить процесс выработки биогаза, где обычно имеется большое количество диоксида углерода (и карбонатов). Метаногенные бактерии будут здесь доминировать, и будут использовать углекислый газ в качестве конечного акцептора электронов. Процесс также включает в себя небольшое количество сульфатредуцирующих бактерий. Они образуют сероводород (H_2S) при использовании сульфата (SO_4^{2-}) в качестве конечного акцептора электронов. Если в процесс было добавлено большое количество сульфата, соотношение между бактериями будет нарушено, то есть сульфатредуцирующие бактерии будут расти за счет метаногенов, которые будут уменьшаться в количестве. Это происходит вследствие того, что сульфатредуцирующие бактерии обычно получают больше энергии в их метаболизме и, следовательно, могут лучше расти.

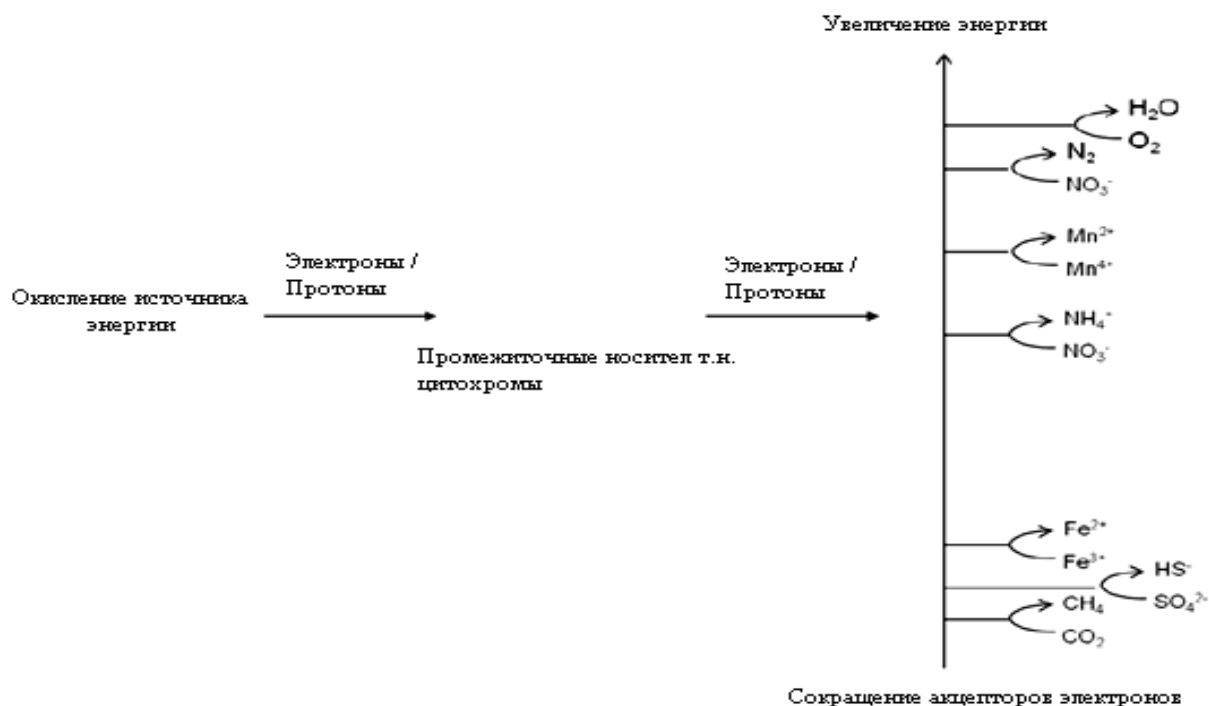


Рис. 1.4.2.1 Поток электронов к различным акцепторам в процессе анаэробного окисления.(12)

1.4.3 Строительные блоки

Наиболее важные строительные блоки это углерод, который обеспечивает около 50% от биомассы микроорганизмов, кислород, азот и водород (Таблица 1.4.3.1).

Другие важные строительные блоки это сера, фосфор, натрий, калий, магний, кальций и хлор. Когда источником энергии является органика, она также обычно используется в качестве источника для строительных блоков.(53,54)

Когда источник энергии является неорганическим, наиболее распространенным источником углерода является диоксида углерода (CO_2), а

наиболее распространенным источником азота является аммиак (NH_3). Энергия образуется путем окисления источника энергии и используется для формирования новых клеток. Состав синтетических питательных растворов для выращивания микроорганизмов часто основывается на структуре клеток (табл. 1.4.3.1). Структура клетки также может быть использована в качестве ориентира для ориентировочного состава оптимального субстрата.(37,38,39,54)

Таблица 1.4.3.1

Примерный состав бактериальной клетки. (12)

Компонент	С	О	N	Н	Р	S	К	Na	Ca	Mg	Fe	Прочее
% от веса сухого вещества	50	20	14	8	3	1	1	1	0.5	0.5	0.5	0.5

1.4.4 Микроэлементы и витамины

Как и другие живые организмы, микроорганизмы нуждаются в различных микроэлементах и витаминах, для своего функционирования. Разные организмы имеют различные требования к этим веществам. Некоторые организмы могут образовывать витамины самостоятельно, в то время как другим необходимо поглощать некоторое количество витаминов из окружающей среды. Микроэлементы всегда берутся из окружающей среды. В процессе брожения, сырье должно поставлять данные микроэлементы микроорганизмам. Однако содержание этих веществ значительно варьируется в различных типах сырья.(52,62,64,65)

Многочисленные научные статьи показали важность микроэлементов для функционирования биогазового процесса и, в частности для метанобразующих организмов.

Несмотря на важность микроэлементов для стабильности процесса и производства биогаза, очевидно, что до сих пор нет формулы для их оптимального состава.

Микроэлементы, которые были признаны важными для метанобразующих организмов, это железо, цинк, никель, медь, кобальт, молибден, а в некоторых случаях селен и вольфрам. (54)

Некоторые исследования также показали, что добавление микроэлементов может стимулировать процесс выработки биогаза и позволить увеличивать органические нагрузки.

Характеристики сырья определяют потребность в добавлении микроэлементов. Например, растительные материалы могут ограничивать процесс анаэробного брожения из-за низкого содержания некоторых микроэлементов. Некоторые биогазовые установки в Германии, которые перерабатывают исключительно растительные материалы (и не используют навоз) нуждаются в добавлении микроэлементов для достижения стабильной работы.(60,61)

1.5 Факторы, влияющие на микроорганизмы

1.5.1 Температура

Оптимальная температура, т.е. температура, при которой организмы растут быстрее и работают наиболее эффективно, варьируется в зависимости от вида организмов. Микроорганизмы могут быть разделены на различные

группы в зависимости от температуры, при которой они лучше всего развиваются и растут: психрофильные, мезофильные, термофильные и экстремофильные / гипертермофильные. (30,31)

Как правило, оптимальная температура для конкретного организма тесно связана с окружающей средой, из которой организм происходит. Например, микроорганизмы, живущие в болотистой местности, тундре или в септиках, могут иметь низкую оптимальную температуру (около 10 ° С) (психрофильный диапазон температур), в то время как человеческие кишечные бактерии, такие как кишечные Эшерихии, лучше всего растут при 37 ° С (мезофильный диапазон температур).(36) Организмы с оптимальной температурой выше 50 °С, называют термофилами, а те, что растут выше 65 °С, называются крайними термофилами.

Некоторые микробные сообщества приспособлены расти даже при более высоких температурах. Микроорганизмы, которые имеют очень высокие оптимальные температуры роста (выше 85 °С) живут в горячих источниках и подводных вулканов. Последние принадлежат к, так называемым, гипертермофилам, у которых клеточные белки и другие компоненты являются неизменными, даже при таких высоких температурах.(50)

Общим для всех интервалов роста является то, что температура, обеспечивающая наибольший уровень развития близка к так называемому максимуму температуры, достижение которого приводит к гибели клеток. Если температура повышается выше этого максимальной температур, белки в клетки и другие компоненты быстро инактивируются, в результате чего организм умирает. Максимальная температура варьируется в зависимости от того, для какой температуры микроорганизм приспособлен (см. рис. 1.5.1.1).

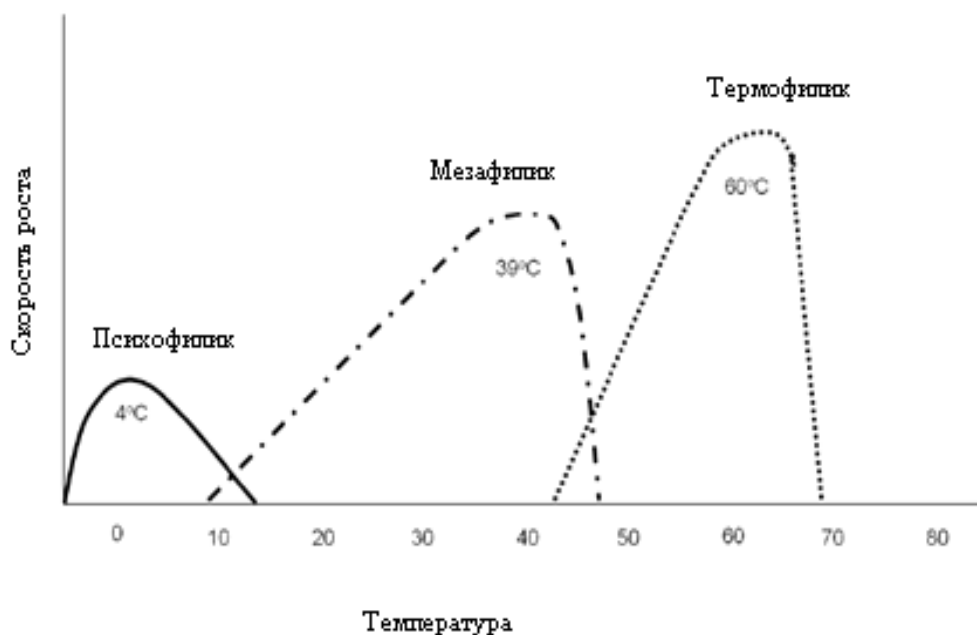


Рис.1.5.1.1. Рост микроорганизмов при различных температурах. (12)

Процесс брожения содержит множество различных организмов и, в некоторой степени, они отличаются тем, как они реагируют на температуру.

Однако обычно процесс анаэробного сбраживания работает при температуре в диапазоне около 30°-40°C или 50°-60°C.

Выработка биогаза возможно и при психрофильных температурах, но это также может привести к более низкой скорости выработки метана в зависимости от типа процесса.

Существуют примеры метанобразующих организмов, живущих и при высоких температурах, которые могут выдерживать 110 °C, но на практике, стабильные процессы брожения при температурах выше 60 °C – 70 °C, не наблюдались. (30,50)

При температурах выше 60 °C, активность метанобразующих бактерий уменьшается в большей степени, чем кислотообразующих организмов, что часто приводит к накоплению жирных кислот.

Рост некоторых микроорганизмов не соответствует кривым, нарисованным на рисунке выше. Примерами являются так называемые термотолерантные микроорганизмы. Они выживают при высоких

температурах (до 60 °С), несмотря на то, что их оптимальный рост находится в мезофильном диапазоне температур. (38,50)

Есть также организмы, способны выжить в мезофильных температурах, несмотря на то, что растут они лучше лучше при более высоких температурах.

Исследования показали, что около 10% микроорганизмов в мезофильных процессах фактически являются термофильными. Присутствие этих организмов позволяет преобразовать мезофильный процесс в термофильный. Глава 2 содержит больше информации об этом. В принципе, широкий спектр организмов, присутствующих в процессе, также делает возможным выработку биогаза и при промежуточных температурах, таких как 45 °С. (4)

1.5.2 Аэрация

Важность концентрации кислорода сильно варьируется для различных микробных сообществ, которые существуют в процессе выработки биогаза. Некоторые из этих организмов, таких как те, которые вырабатывают метан, очень чувствительны к кислороду и гибнут при контакте с воздухом. (27,33-35)

Другие могут выдержать достаточно низкую концентрацию кислорода, в то время как третьи растут лучше, если кислород присутствует. Свободные радикалы кислорода являются сильными окислителями, которые могут разрушать клетки путем окисления различных её компонентов. (28,29)

Микроорганизмы, которые могут жить при наличии кислорода, имеют различные системы защиты, то есть, различные ферменты, которые могут защитить клетки от окисления кислородом. Организмы, чувствительные к

кислороду не имеют этой ферментативной системы защиты и разрушаются в присутствии воздуха. (30,31,34)

Микроорганизмы, как правило, разделены на различные группы в зависимости от их чувствительности к кислороду.

В процессе выработки биогаза присутствуют как строгие анаэробы, так и так называемые факультативные аэробы.

Строгие анаэробы растут только в отсутствие кислорода. Эта группа включает метаногенные бактерии. С другой стороны, факультативные аэробы растут как при наличии, так и в отсутствие кислорода. Эта группа включает в себя многочисленные ферментативные микроорганизмы.(36,56)

В присутствии кислорода, они могут вырасти при аэробном окислении, но затем они переключаются на ферментацию при нехватке кислорода. Это означает, что временная утечка воздуха в процессе анаэробного брожения не является проблемой, потому что существуют микроорганизмы, которые могут быстро поглощать входящий кислород. Существуют исследования, которые показывают, что краткая аэрация в процесс выработки биогаза может быть способом снижения концентрации жирных кислот.(42,43,54,58)

Таблица 1.5.2.1

Важность кислорода для различных микробных сообществ.(12)

<i>Строго аэробные</i>	<i>Факультативно аэробные</i>	<i>Кислородо-толерантные</i>	<i>Микро-аэрофильные</i>	<i>Строго анаэробные</i>
Всегда дышат кислородом	Могут дышать кислородом, но могут переключиться на ферментацию или анаэробное дыхание в отсутствие	Могут жить в присутствии кислорода, но всегда проводят ферментацию	Дышат кислородом, но только при более низкой концентрации, чем в атмосфере (<20%)	Не требуют кислорода для их роста и даже могут погибнуть в его присутствии. Всегда проводят

	кислорода			анаэробное дыхание или ферментацию
--	-----------	--	--	------------------------------------

1.5.3 Кислотность среды

Большинство микроорганизмов предпочитает нейтральный диапазон рН, т.е. около рН 7,0 – 7,5. Однако некоторые организмы активны как при более низких, так и при более высоких значениях рН.

Есть несколько различных организмов в процессе выработки биогаза, и их требования по уровню рН для оптимального роста сильно различаться.

Во время брожения, кислотообразующим микроорганизмам удается жить в относительно кислой среде, вплоть до рН 5,0; большинство метанообразующих бактерий обычно требуют нейтральные значения рН для своей активности.(1)

Хотя большинство метаногенов работают лучше при нейтральных значениях рН, они остаются активными и вне нейтрального уровня.

Существуют известные примеры ацидофильных метаногенов, которые растут до рН 4,7 и алкалофильный, которые растут при значениях рН до 10.

Несколько биогазовых станций, работающих в настоящее время в Швеции, функционируют при значениях рН около 8, а литература также содержит примеры процессов, работающих при значениях рН ниже 6.

Тот факт, что кислотообразующие организмы могут в процессе своей жизнедеятельности понизить уровень рН, свидетельствует о том, что разложение субстрата часто начинается уже в буферных ёмкостях, что приводит в результате к понижению уровня рН.(55)

Тем не менее, метанообразование обычно не происходит здесь именно потому, что уровень рН слишком низкий. Вместо этого, оно начинается в ферментаторах, где уровень рН значительно выше.(43)

Рост микроорганизмов на различных диапазонах рН часто происходит по той же схеме, как рост при различных температурах. То есть, для всех интервалов роста, значение рН, приводящее к наибольшей скорости протекания процесса, обычно очень близко к уровню рН, приводящему к гибели клеток.(1)

1.5.4 Воздействие солей на жизнь и деятельность микроорганизмов

Все микроорганизмы требуют соли для функционирования. Соли содержат необходимые строительные блоки для микроорганизмов, таких как натрий, калий и хлор.

Эти вещества доступны в различных субстратах и не нуждаются в отдельном добавлении. Тем не менее, некоторые отходы имеют высокую концентрацию солей, или приводит к высвобождению избыточных солей, которые может ингибировать микроорганизмов. Соли (и сахара), как правило, оказывают консервирующее действие, то есть они задерживают рост бактерий.(7)

Слишком много солей (или сахаров) заставляет клетку откачать воду, и влияют как на размножение, так и на функционирование.(13,14,15)

Некоторые организмы могут адаптироваться к высоким концентрациям солей, если концентрации солей повышаются медленно и у бактерий есть время адаптироваться.(32,34)

Они часто образуют так называемые осмолиты: соединения, которые помогают им сохранить свои функции, даже в присутствии солей.

Организмы, которые могут выдерживать относительно высокие концентрации солей, называются галотолерантными, а те, которые растут еще лучше при высоких концентрациях солей, называются галофилами.(20,28,35,41)

Наиболее крайние формы галофилов лучше всего растут при концентрации хлорида натрия выше 20% -30% (> 3.4 моль/литр – 5.1 моль/литр), и эта группа также включает в себя некоторое количество метаногенов. Примеры материалов, которые могут привести к увеличению концентрации солей в биогазовых процессах, являются отходы пищевой и рыбной промышленности, или различные типы богатых белком материалов, которые приведут к образованию аммиака. Как правило, метанобразующие микроорганизмы, наиболее страдают от увеличения концентрации солей в биогазовом процессе. (7,11,13)

1.6 Перспективы развития технологии в России

Таким образом, при интенсивном подъеме сельскохозяйственного производства России через несколько лет общий объем производимых органических отходов может значительно вырасти, а при использовании биогазовых станций, вырастет и производство биогаза.

Высокая рентабельность отечественных биогазовых технологий обеспечивается одновременным производством высокоэффективных органических удобрений, 1 т которых (по эффекту «на урожай») равноценна 70-80 т естественных отходов животноводства и птицеводства. Этим объясняется быстрая (1-2 года) окупаемость биогазовых установок и биотеплоэлектростанций.

Исследование современного АПК России, проведенное Институтом энергетической стратегии, показало, что до 50% производимой основной продукции приходится на индивидуальные крестьянские хозяйства. Поэтому развитие биогазовой промышленности должно идти по двум направлениям: создание крупных биоэнергетических станций и создание фермерских и крестьянских биогазовых установок.

Россия находится в зоне рискованного земледелия и по климатическим условиям, и по характеристике большая часть почв – малоурожайные подзолистые почвы, требующие постоянного внесения органических удобрений. Поэтому в средних и северных регионах Европейской России, в земледельческих районах Сибири потребность в органических удобрениях будет постоянной, и она будет определяющей в развитии биогазовых технологий. Использование таких технологий и созданного на их основе оборудования позволит в ближайшие годы полностью решить в сельской местности проблему всех органических отходов, включая коммунальные стоки и ТБО, обустроить дома сельских жителей современными санитарно-гигиеническими системами европейского типа и оказать существенную помощь в решении проблем энергосбережения. (69)

ГЛАВА 2. ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКАЯ ЧАСТЬ

Экспериментальная часть магистерской диссертации была выполнена на базе кафедры биотехнологии и микробиологии Института инженерных технологий и естественных наук ФГАОУ ВО НИУ БелГУ.

2.1 Объект исследования

Для исследования был взят образец эфлюента, сразу после процесса сепарации «Дображиватель»

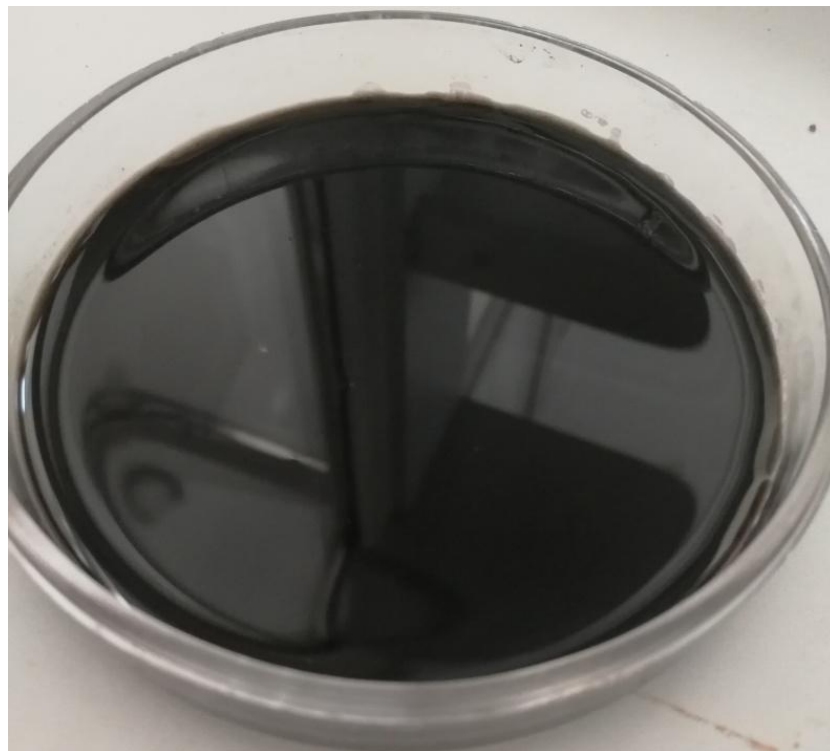


Рис. 2.1.1. Побочный продукт «дображиватель»

Предметом исследования стал количественный и качественный состав активности микрофлоры взятого нами образца.

Анализ микрофлоры проводился по группе: КМАиФАнМ (количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов).

2.2 Методы исследования

2.2.1 Анализ микрофлоры эффлюента методом разбавления

Приготовление питательных сред.

Для микробиологического исследования сыра нами были приготовлены две питательные среды: питательный агар (МПА) (рис. 2.2.1.1.) и ЛЕВИНА (рис. 2.2.1.2.).

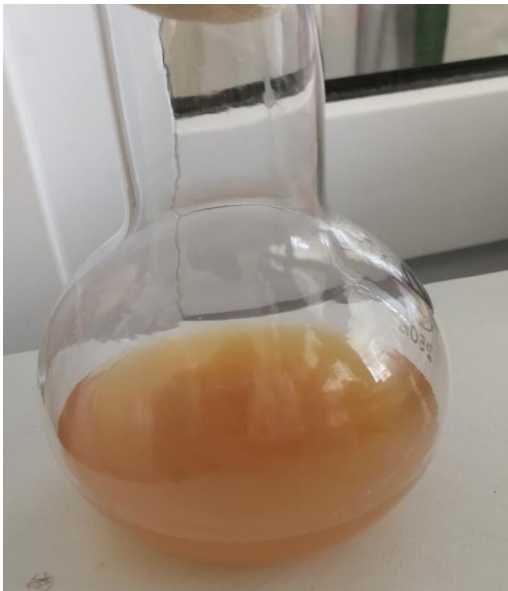


Рис.2.2.1.1. Питательный агар (МПА)

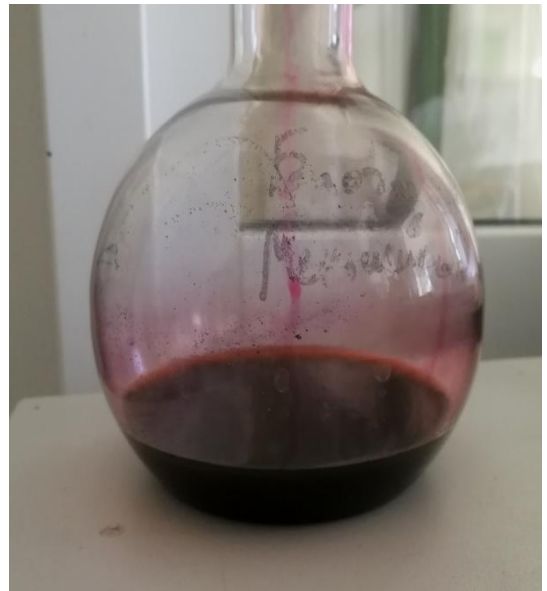


Рис.2.2.1.2. Питательный агар (Левина)

Агар ЛЕВИНА является дифференциально-диагностической средой. Эту среду рекомендуют для выделения, подсчета и дифференциации грамотрицательных микроорганизмов кишечной группы.

В коническую колбу наливали 250 мл дистиллированной воды, добавляли 12,5 г ЛЕВИНА. Количество среды рассчитывали по пропорции: на 1 л дистиллированной воды требуется 50 г АГАРА ЛЕВИНА (среду при этом добавляли постепенно, медленно помешивая, до образования однородной массы). Закрывали колбу пробкой и подогревали на плитке до начала кипения (среда приобретает красный цвет). Помещали среду на автоклавирование при температуре 120 °С в течение 20 мин (фаза выдержки) для полного ее приготовления.

Питательный агар (МПА) – в коническую колбу наливали 250 мл проточной воды, добавляли 12,5 г среды (при этом количество среды рассчитывали по той же пропорции, что и в первом случае). Постепенно добавляя среду в колбу, медленно помешивали во избежание появления комочков. Среду ставили на автоклавирование при температуре 120 °С в течение 20 мин (фаза выдержки).

Приготовленную и простерилизованную питательную среду разливали под пламенем горелки (в радиусе 10-15 см) в заранее подготовленные чашки Петри, которые также были простерилизованы в сушильном шкафу при температуре 170 °С в течение 2 часов. Слегка покачивая чашки, распределяли среду равномерно по их дну и оставляли стоять на ровной поверхности.

Приготовление разбавлений.

Для микробиологического анализа микрофлоры мы использовали, согласно ГОСТ Р 53430-2009, два разбавления – 1:100000 и 1:1000000 (I.6).

Водопроводную воду разливали по 9,3 мл в пять стерильных маркированных сухих пробирки и 85 мл – в небольшую коническую колбу. Пробирки с колбой автоклавировали вместе со средой.

Затем взвешивали 15 г сырья на лабораторных весах и растирали в стерильной ступке до образования однородной массы. Эту массу смешивали со стерильной водопроводной водой из колбы, тщательно перемешивая (разбавление 1:10). После чего 1 мл исследуемой суспензии стерильным инсулиновым шприцем переносили в первую пробирку с 9 мл стерильной воды, получали первое разбавление (0,01 или 1/100). Тщательно перемешивали содержимое пробирки, вбирая в шприц и выпуская из него полученную взвесь (17). Затем шприцем отбирали 1 мл суспензии из первой пробирки и переносили во вторую, получая, таким образом, второе разбавление (0,001 или 1/1000). Данную процедуру мы повторяли несколько раз, до получения разбавления (0,000001 или 1/1000000).

Для приготовления каждого разбавления мы использовали новый стерильный инсулиновый шприц во избежание получения ошибочного результата.

Затем из каждого разбавления, тщательно взболтав его на вортексе, мы брали по 0,1 мл суспензии и высевали на чашки Петри поверхностным способом, распределяя бактериальную суспензию равномерно по поверхности чашки стерильным шпателем, обжигая его каждый раз под пламенем спиртовки. (17,20) На рисунке 2.2.1.3. представлена схема разбавления пробы при анализе микрофлоры побочных продуктов.

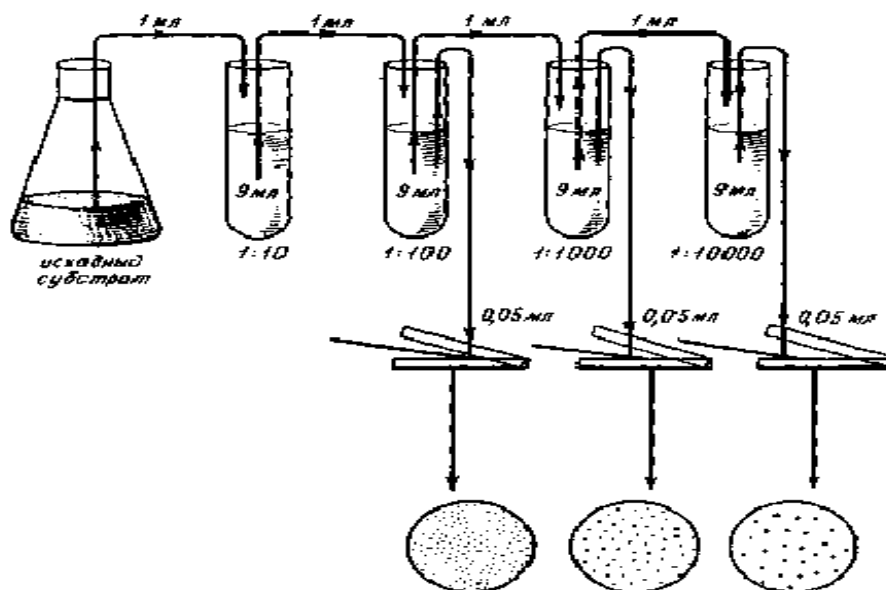


Рис.2.2.1.3. Схема разбавления пробы при анализе микрофлоры сырря (П.45) (12)

Для каждой среды мы использовали по 24 чашки Петри, по двенадцать на каждое разбавление и по шесть чашек на каждую исследуемую повторность.

После произведенного посева на боковой стенке чашек Петри мы отмечали степень разбавления, номер чашки, температуру и дату посева. Все чашки Петри помещали в термостаты крышками вниз (во избежание появления конденсата) с разной температурой. Чашки с посевами на среде МПА, согласно ГОСТ Р 53430-2009, инкубировались 72 часа, с посевами на среде ЭНДО – 24 часа (17,20).

Подсчет колоний микроорганизмов.

Выросшие колонии рассматривали через стекло, не открывая чашки Петри. Если колоний немного, считали их на всей поверхности чашек. При большом количестве колоний чашки Петри помещали на лист черной бумаги, каждую делили на восемь секторов, производили подсчет в трех секторах, после чего находили среднее арифметическое и умножали на общее количество секторов. Описание колоний, выросших на питательных средах,

производили по следующим показателям: форма, характер поверхности, цвет и край (ровный, волнистый и др.) (17).

2.2.2 Методы микроскопического исследования микроорганизмов

Метод раздавленной капли.

Данный метод был нами использован для определения подвижности бактерий. На середину чистого предметного стекла, мы наносили каплю водопроводной воды, затем стерильной микробиологической петлей добавляли небольшое количество бактерий, хорошо перемешивая полученную бактериальную суспензию. Сверху каплю накрывали покровным стеклом, предварительно подкрасив ее красителем (карболовый фуксин). Рассматривали препарат под микроскопом при большом увеличении. При этом в поле зрения можно было наблюдать подвижные формы микроорганизмов.

Фиксированный препарат.

Данный метод мы использовали для определения формы бактериальных клеток. Работу начинали с приготовления мазка, который высушивали на воздухе либо над пламенем спиртовки. При этом важно было не допустить перегрева мазка, так как при этом может произойти свертывание белков протоплазмы бактериальной клетки. Затем мы производили фиксирование препарата путем быстрого проведения покровного стекла над пламенем горелки, что обеспечивает лучшее прикрепление мазка к стеклу. После этого

– окрашивали препарат раствором карболового фуксина, промывали водопроводной водой, высушивали и рассматривали при большом увеличении.

Метод окраски по Граму.

Данный метод основан на способности клеток микроорганизмов удерживать красители трифенилметанового ряда.

Готовили фиксированный мазок на чистом предметном стекле, сверху помещали полоску фильтровальной бумаги и наносили краситель. Через 1 – 2 минуты снимали бумагу и, не промывая, наносили на мазок каплю йода. Через 1 мин обесцвечивали мазок спиртом и окрашивали красителем (карболовым фуксином). Затем смывали остатки красителя водой, высушивали над пламенем спиртовки и рассматривали под микроскопом при большом увеличении. При этом, грамположительные бактерии окрашивались в сине-фиолетовый цвет, а грамотрицательные – в розовый.

Метод обнаружения капсул у бактериальных клеток.

На чистое предметное стекло в каплю туши стерильной микробиологической петлей добавляли небольшое количество бактериальной суспензии. Далее накрывали покровным стеклом и рассматривали при большом увеличении под микроскопом. Темная область вокруг клеток бактерий – это и есть капсула или слизистый чехол (17).

2.2.3 Методы исследования биологической активности

Биологическую активность определяют, пользуясь самыми различными микробиологическими (прямой подсчет микроорганизмов разных групп

бактерий, актиномицетов, грибов и определение количества микробных зачатков на разных питательных средах), биохимическими (определение ферментативной активности, АТФ, ДНК), физиологическими (физиологический метод определения биомассы микроорганизмов, определение дыхания почв) и химическими (определение нитратов, нитритов, аммония) Все методы можно разделить на две группы:

1) методы определения актуальной (полевой) биологической активности в (полевые методы определения дыхания, азотфиксации, денитрификации, некоторые изотопные методы);

2) методы определения потенциальной биологической активности, т.е. той активности, которая обнаруживается в лаборатории при оптимальных условиях для протекания данного процесса (определение ферментативной активности лабораторные методы определения нитрификации, азотфиксации, денитрификации, интенсивности дыхания). Ко второй группе методов относятся и определение численности микроорганизмов прямыми методами или посевом, определение ДНК, мурамовой кислоты, хлорофилла, физиологический метод определения микробной биомассы, так как они позволяют определить только потенциальные возможности микроорганизмов в почве, но не дают представления об активной части микроорганизмов в определенный момент (Звягинцев, 1987). (4,5)

2.2.3.1 Метод сахаролитической активности микроорганизмов

Питательную среду Гисса рекомендуют для определения ферментативной способности микроорганизмов. В зависимости от наличия в

микробной клетке того или иного фермента она способна разлагать какой-либо один углевод с образованием определенных продуктов разложения, поэтому в состав среды вводится какой-либо углевод: лактоза, глюкоза, сахароза, фруктоза, мальтоза и пр. Набор таких сред получил название «пестрого ряда углеводов»

Сначала готовят пептонную воду: на 1 л дистиллированной воды берут 10 г пептона и 5 г химически чистой поваренной соли, кипятят до растворения пептона фильтруют через бумажный фильтр (фильтрат должен быть совершенно прозрачным) и устанавливают рН 7,2–7,4. Затем к 100 мл пептонной воды добавляют 0,5 г одного из применяемых углеводов и по 1 мл индикатора Андрее.

В состав индикатора Андрее входит: 0,5 г кислого фуксина, 16мл 1н раствора едкого натра (NaOH) и 100 мл дистиллированной воды. При необходимости индикатор можно готовить заранее и сохранять его в темном месте.

Среды Гисса с реактивом Андрее имеют соломенно-желтый цвет без розового оттенка. При развитии в среде микроорганизмов последние, разлагая сахар с образованием кислоты, вызывают изменение реакции. А так как в кислой среде индикатор Андрее краснеет, то это и является свидетельством, что микроорганизм использует данный сахар для своей жизнедеятельности. Отсутствие покраснения наоборот свидетельствует об отсутствии в ферментативном комплексе изучаемого микроба фермента, разлагающего имеющийся в среде углевод.

Примечание: К– кислотообразование (изменение цвета среды); Г– образование газа (появление пузырьков в глубине или на её поверхности); «–» – отсутствие проявления признаков; *) – слабая реакция.

Учёт результатов проводят через 18–20 часов инкубации при температуре $(37\pm 1) ^\circ\text{C}$. В случае положительной реакции происходит образование кислоты с изменением цвета среды, образование газа

сопровождается появлением «пузырьков» (см. рис. 2.2.3.1.1). Отрицательная реакция характеризуется отсутствием характерных признаков роста в среде.

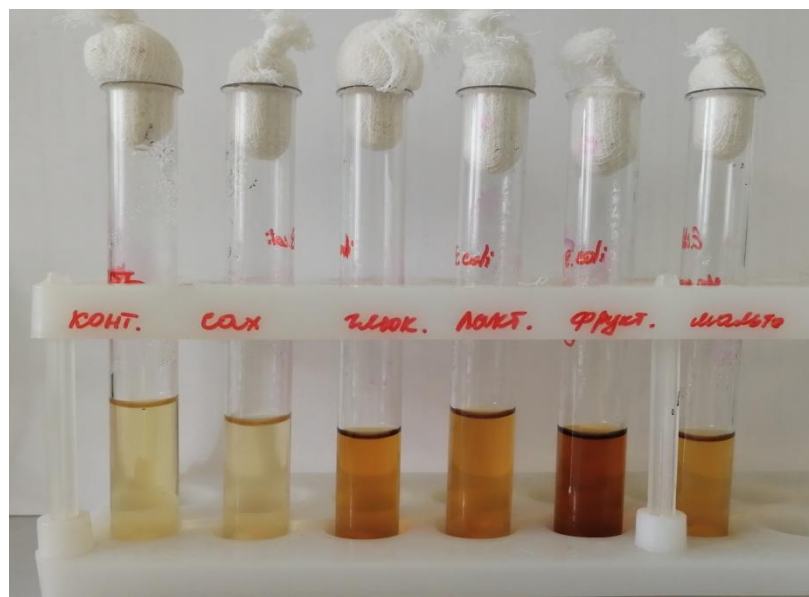


Рис. 2.2.3.1.1. Питательная среда Гисса с различными углеводами.

2.2.3.2 Метод определения протеолитической активности микроорганизмов

На молочном агаре Эйкмана. Молочный агар Эйкмана, разлитый и остуженный в чашках Петри, засевают исследуемой культурой микробов. Посев делают петлей или шпателем так, чтобы получить изолированные колонии. Через 24 – 48 ч инкубации в термостате культуры, продуцирующие протеолитический фермент, обуславливают пептонизацию молочного белка – казеина, в результате чего вокруг таких колоний образуются прозрачные зоны, четко выделяющиеся на общем молочно-мутном фоне среды.

Среду для обнаружения протеолитической активности микроба готовят следующим образом. К расплавленному 2% мясопептонному агару добавляют 20% стерильного молока. Все тщательно перемешивают и разливают в чашки Петри. Застывший агар в чашках должен иметь

равномерно мутный вид. Обезжиренное (снятое) молоко следует стерилизовать отдельно. При стерилизации с агаром молоко может выпадать хлопьями и равномерное его распределение в среде не достигается. На этой среде вокруг выросших колоний бактерий, обладающих протеолитическим действием, образуются прозрачные зоны, ширина которых зависит от активности гидролиза белков молока (см. рис.2.2.3.2.1).

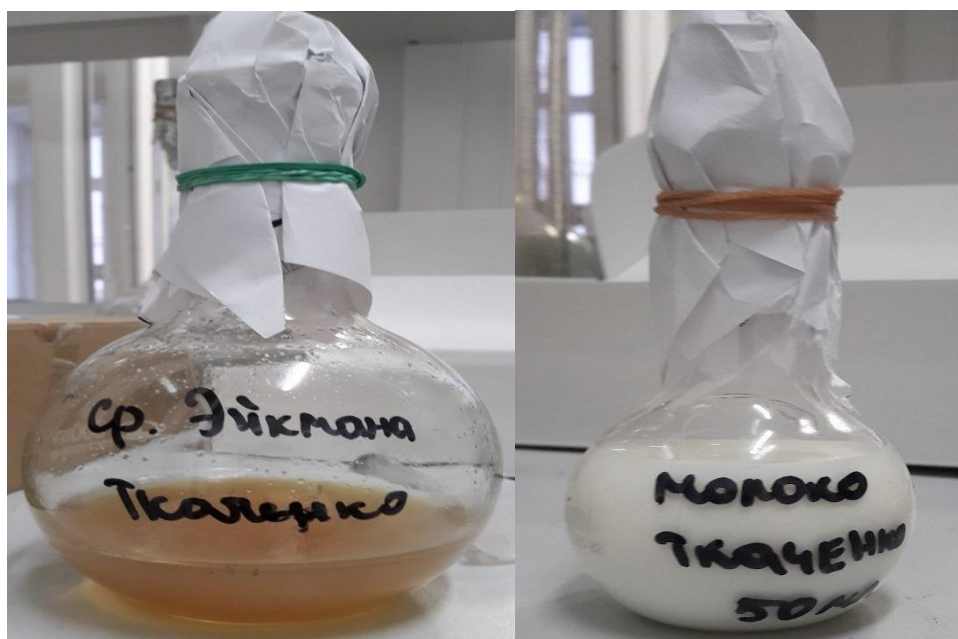


Рис. 2.2.3.2.1.. Питательная среда Эйкмана.

2.2.4 Метод определения микроорганизмов до вида

Выделение культуры: Выделите чистую культуру, пользуясь общепринятыми в микробиологии методами на неселективной среде (кровяной агар). Выполните тест на обнаружение цитохромоксидазы (с помощью полосок ОКСИтест), а также на способность ферментировать глюкозу (ОФ-тест) для определения принадлежности выделенных изолятов к семейству Enterobacteriaceae.

Энтеробактерии не обладают цитохромоксидазной активностью и способны ферментировать глюкозу. Приготовление суспензии: Подготовьте

суспензию в физиологическом растворе из чистой 24-часовой культуры, тщательно гомогенизируйте ее (мутность должна соответствовать 1 степени по шкале мутности McFarland).

При работе с суспензией более высокой или более низкой степени мутности могут быть получены неправильные результаты. Параллельно сделайте посев суспензии культуры на неселективную среду для проверки чистоты культуры, ее ростовых свойств и/или для постановки дополнительных тестов; инкубируйте в течение 24 часов при температуре 37 °С. Работа со смешанной культурой также может приводить к неправильным результатам.

Подготовка стрипов: Откройте алюминиевую упаковку по сварному шву и достаньте планшеты. Возьмите необходимое количество стрипов из пластинки (1 трехрядный стрип содержит 24 теста на одну культуру). Удалите адгезивную пленку с индивидуальных стрипов, вставьте их в подготовленную рамку. В том случае, если Вы работаете с набором Микро-Ла-Тест впервые, и у Вас нет свободной рамки, используйте рамку первой пластинки. Неиспользованные стрипы из первой пластинки поместите в пакет для хранения неиспользованных пластинок. Напишите номера штаммов на соответствующие стрипы. Остаток неиспользованных стрипов с силикагелем поместите в алюминиевый пакет для частично использованных пластинок и положите в холодильник для последующего использования; пластинку необходимо предохранять от влаги. Не рекомендуется хранить пластинку более 4 недель с момента ее вскрытия.

Внимание: Оставляйте свободное место между стрипами. Таким образом можно уменьшить риск возможной ошибки, связанной с контаминацией соседних стрипов при внесении суспензии.

Внесение суспензии: Хорошо гомогенизируйте подготовленную суспензию (используйте встряхиватель типа Vortex). Инокулируйте по 0,1 мл суспензии во все лунки, соответствующих трех рядов стрипа. После инокуляции добавьте в лунки H, G, F, E и D первого ряда (тесты URE, ARG,

ORN, LYS, H2 S) по 2 капли парафинового масла. Лунки, в которые необходимо добавить масло, отмечены на крышке – После использования крышку необходимо обработать этанолом. Для определения продукции индола Вы можете также использовать КОЛИТест. Для это Вам необходимо погрузить полоску в остатки бактериальной суспензии (после внесения суспензии в набор) так, чтобы зона была полностью смочена. Рекомендуемый объем суспензии 1 мл (альтернативно можно использовать 0,5 мл). Инкубируйте при 37 град. в течение 24 ч. После этого добавить 8 капель реактива для теста Индол (при использовании 0,5 мл суспензии - 4 капли). Считайте результаты.

Инкубация: Вложите пластинку в пакет из полиэтилена, открытый конец пакета загните под пластинку, чтобы инокулят не высыхал при инкубации. Инкубируйте инокулированную пластинку в течение 24 часов при температуре 37 °С.

Учет результатов: Проверьте рост и чистоту культуры на контрольной чашке. При отсутствии роста увеличьте время инкубации еще на 24 часа. Используя цветную шкалу для ЭНТЕРОтеста 24 (или изменение цвета в лунках с контрольными штаммами), учтите результаты всех реакций и занесите в бланки. Если Вы работаете с анализатором Мультикан Ассент, проведите считывание результатов на нем, используя программу «Микроб-Автомат».

Идентификация: Интерпретируйте полученные данные с помощью таблицы в инструкции, «Книги кодов» или программы «Система микробиологического мониторинга «Микроб-2» При окончательной идентификации следует учитывать всю дополнительную информацию (источник выделения, характер колоний, наличие пигмента, микроскопию и другие характеристики). В случае выделения сальмонелл и шигелл подтвердите идентификацию серологически. При неудовлетворительной идентификации следует повторить исследование или же дополнить идентификацию другими тестами.

Внимание: Для идентификации при помощи «Книги кодов» бланк для регистрации результатов позволяет легко получить так называемый профиль, т.е. цифровой код, по которому можно найти результат идентификации в Книге кодов. Процесс расчета профиля описан в Книге кодов.

Дезинфекция: После употребления тест-системы подлежат обеззараживанию в дезинфицирующем растворе либо автоклавированию. Бумажную упаковку сдайте в макулатуру (см. Методические указания и книга кодов для MIKRO-LA-TEST, ENTEROtest 24 N: 1089p.).

2.2.5 Статистическая обработка цифровых данных

Математическую статистику, прежде всего, используют для планирования опытов. Ее основной задачей является определение достоверности полученных результатов. В любом опыте должно быть достаточное количество вариантов и повторяемостей. Все варианты должны находиться в одинаковых условиях. Не менее важным фактором является определение числа образцов для исследования – оптимизация объема выборки.

В проведенных опытах определяют достоверность различий между средними арифметическими исследуемых выборок (образцов). Данные задачи решают с помощью применения критериев достоверности Стьюдента (t) и Фишера (F). Критерий (t) – это показатель, позволяющий судить о надежности выводов, подтверждающих или опровергающих рабочую гипотезу.

Математическую статистику можно применять лишь в правильно спланированных и проведенных опытах. Если опыты не отвечают необходимым условиям, их следует немедленно браковать.

Перед статистической обработкой все данные необходимо соответствующим образом подготовить: округлить, вычислить средние арифметические, а также выбраковать сомнительные данные.

Для статистической обработки цифровых данных мы применили два метода: метод описательной статистики и разностный метод.

В ходе исследования нами были рассчитаны статистические показатели, характерные для малых выборок.

- средние арифметические;
- стандартные ошибки;
- дисперсии;
- стандартные отклонения;
- критерий Стьюдента (t).

Данные расчеты проводились нами в программе Microsoft Office Excel 2003 с помощью описательной статистики.

Обработка полученных данных разностным методом включала несколько этапов:

- Вычисление среднего арифметического значения по всем повторностям (x_{cp});
- Вычисление разности (d) между данными по повторностям;
- Определение среднего арифметического разности (d_{cp});
- Расчет отклонения между каждой разностью и средним значением ($d - d_{cp}$);
- Возведение данного отклонения в квадрат и его суммирование

$$(\sum(d - d_{cp})^2);$$

- Вычисление ошибок разностей (S_d) по следующим формулам:

$$S_{d(1-2)} = \sqrt{\frac{\sum(d - \bar{d})^2}{n(n-1)}}; S_{d(1-3)} = \sqrt{\frac{\sum(d - \bar{d})^2}{n(n-1)}}.$$

- Вычисление критерия Стьюдента фактического:

$$t_{(1-2)} = (x_{2cp} - x_{1cp}) / S_{d(1-2)}; t_{(1-3)} = (x_{3cp} - x_{1cp}) / S_{d(1-3)}$$

Фактический критерий мы сравнивали с теоретическим и делали выводы, пользуясь следующим правилом: если фактический критерий Стьюдента равен теоретическому значению или больше него, то разность между вариантами существенна.

Теоретические значения критериев мы брали из таблицы числа степеней свободы, которое вычисляли по формуле:

$$v = (n_1 - 1) + (n_2 - 1)$$

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1 Групповой анализ микрофлоры побочного продукта производства биогаза. Численность микроорганизмов, выросших на питательных средах

Анализ численности КМАиФАНМ произведенный нами в исследуемом эффлюенте. Посев производился на питательный агар – поверхностным способом, строго соблюдая условия ранее упомянутой методики.

В таблице 3.1.1. приведены цифровые данные о количестве КМАиФАНМ в исследуемом нами объекте «Дображиватель».

Таблица 3.1.1.

Количество колоний КМАиФАНМ в эффлюенте «Дображиватель» в разведении 10^6 по дням инкубации (дата посева 12.02. и 2.05.2018 г.)

Дата инкубации	№ чашки Петри					
	°С	1	2	3	4	5
13.02.18	25	12	16	13	20	17
1 день	34	16	20	25	24	26
14.02.18	25	70	68	83	78	90
2 день	34	78	85	89	95	98
15.02.18	25	193	203	182	195	191
3 день	34	213	258	271	293	300

03.05.18	25	11	12	11	17	20
1 день	34	12	18	21	18	23
4.05.18	25	75	87	81	98	105
2 день	34	98	117	135	158	170
5.05.18	25	189	198	211	227	248
3 день	34	195	228	261	299	301

Таблица 3.1.2.

Количество колоний БГКП в эффлюенте «Дображиватель» в разведении 10^6
по дням инкубации (дата посева 12.02. и 2.05.2018 г.)

Дата инкубации	№ чашки Петри					
	°C	1	2	3	4	5
13.02.18	25	3	1	8	11	6
1 день	34	4	11	14	15	12
14.02.18	25	96	101	120	127	131
2 день	34	144	149	156	180	160
15.02.18	25	169	187	199	183	201
3 день	34	257	240	245	285	302
03.05.18	25	13	24	25	23	26
1 день	34	25	42	35	33	27
4.05.18	25	72	68	81	93	110
2 день	34	114	147	153	124	173
5.05.18	25	186	194	206	212	234

3 день	34	275	290	303	348	353
--------	----	-----	-----	-----	-----	-----

Исходя из приведённых данных в таблицах 3.1.1 и 3.1.2, можно сделать вывод о том, что на дату посева 2.05.18 количество КМАиФАНМ наибольшее, а при 12.02.18- наименьшее. Разница количества колоний выросших на чашках Петри в разное время посева, может объясняться погодными условиями, влияющими на активность микроорганизмов, а так же моментом подкормки микроорганизмов, поскольку производство биогаза вышло на уровень непрерывного процесса, таким образом, некоторые микроорганизмы населяющие субстрат замирают или погибают, находясь в условиях так называемого «стресса».

3.2 Микроскопическое исследование микрофлоры эффлюента

Для дальнейшего анализа микрофлоры эффлюента мы провели микроскопическое исследование колоний, выросших в чашках Петри. Данные колонии анализировались нами по морфологическим признакам: форма, характер поверхности, цвет, край. Кроме того, в ходе исследования мы определяли, помимо формы самих бактериальных клеток, принадлежность микроорганизмов к грамположительным или к грамотрицательным с помощью метода окраски по Грамму.

В ходе данного анализа на питательном агаре мы обнаружили и определили следующие роды микроорганизмов: *Escherichia*, *Enterococcus*, *Solmonella*, *Bacillus*, *Enterobacterium*, *Proteus*. На рисунках 3.2.1., 3.2.2., 3.2.3, 3.2.4, 3.2.5 и 3.2.6. представлены микропрепараты данных бактерий.

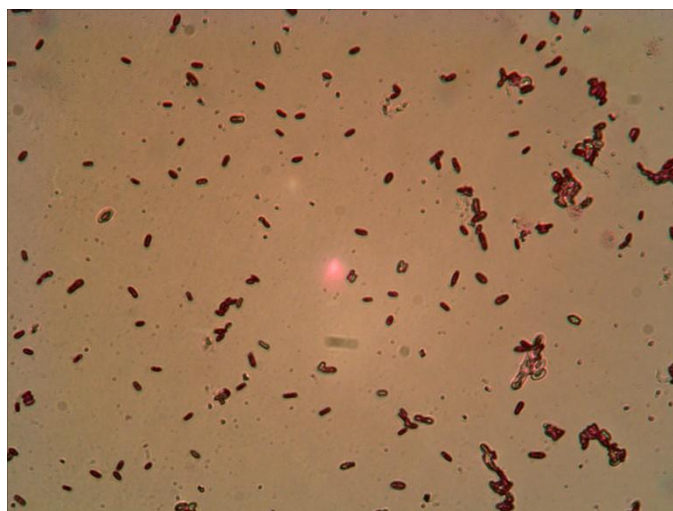


Рис. 3.2.1 Колония микроорганизмов *Escherichia sp* населяющая субстрат «Дображиватель». Фиксированный препарат, окраска фуксином, увеличение 1000.

Клетки этих бактерий имеют палочковидную форму, одиночные или в парах. Для них характерны капсулы или микрокапсулы, Грамотрицательные. Факультативные анаэробы, оптимальная температура 37°C.

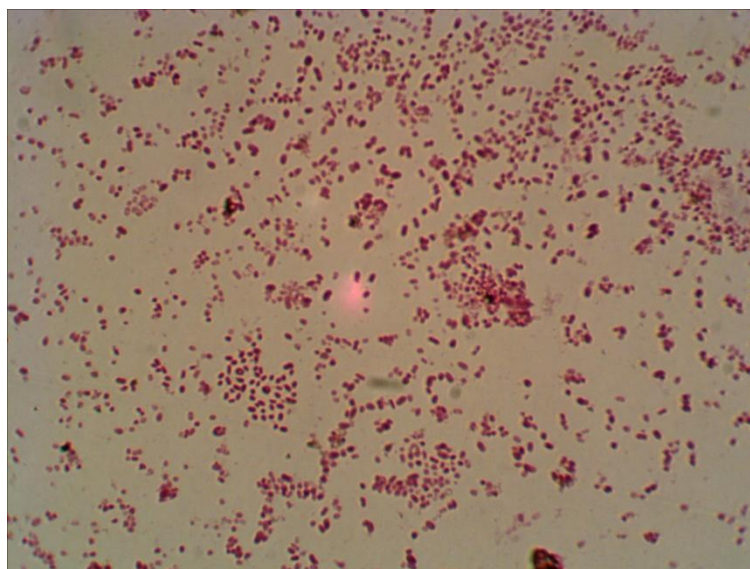


Рис. 3.2.2. Колония микроорганизмов *Enterococcus sp* населяющая субстрат «Дображиватель». Фиксированный препарат, окраска фуксином, увеличение 1000.

Клетки этих бактерий имеют форму кокков. Грамположительные. Факультативные анаэробы, оптимальная температура 10-45°C.

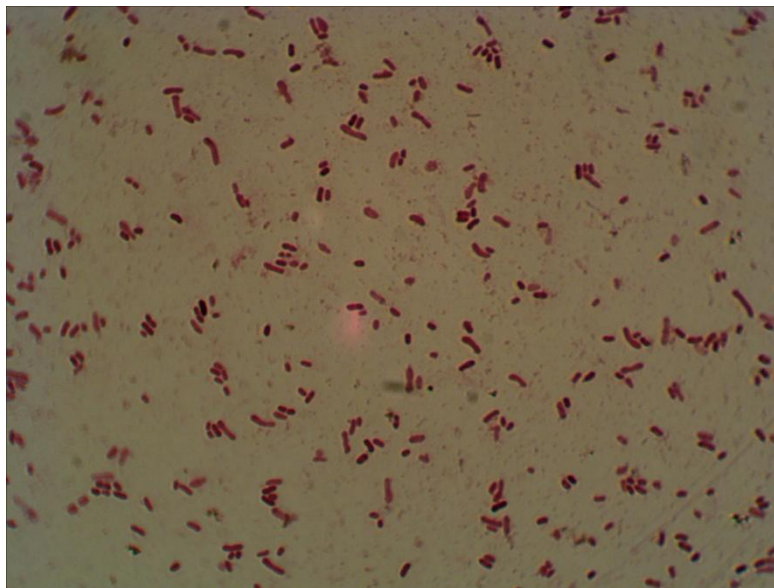


Рис. 3.2.3. Колония микроорганизмов *Solmonella sp* населяющая субстрат «Дображиватель». Фиксированный препарат, окраска фуксином, увеличение 1000.

Клетки этих бактерий имеют палочковидную форму. Грамотрицательные. Факультативные анаэробы, оптимальная температура 37°C.



Рис. 3.2.4. Колония микроорганизмов *Bacillus sp*. Фиксированный препарат, окраска фуксином, увеличение 1000.

Клетки бактерий имеют форму палочки с округлёнными концами. Грамположительные. Аэробы или факультативные анаэробы.

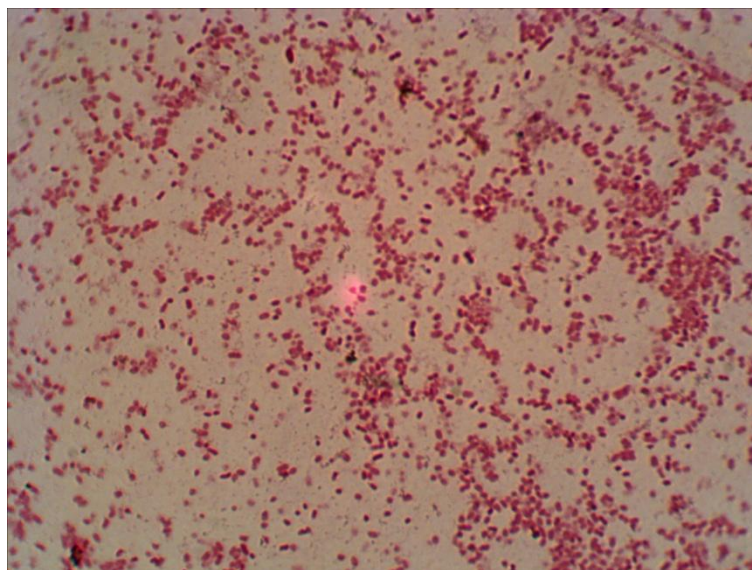


Рис. 3.2.5. Колония микроорганизмов *Enterobacterium sp* населяющая субстрат «Дображиватель». Фиксированный препарат, окраска фуксином, увеличение 1000.

Клетки этих бактерий имеют форму мелких палочек. Грамотрицательные.

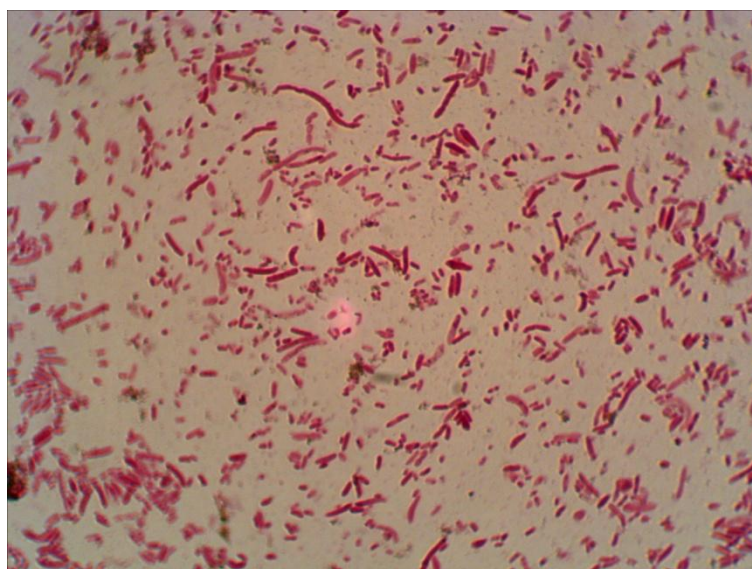


Рис. 3.2.6. Колония микроорганизмов *Proteus sp* населяющая субстрат «Дображиватель». Фиксированный препарат, окраска фуксином, увеличение 1000.

Клетки этих бактерий имеют палочковидную форму. Грамотрицательные. Факультативные анаэробы, оптимальная температура 37°C.

Исследуя микропрепараты каждого анализируемого типа эффлюента, были обнаружены микроорганизмы таких родов, как *Solmonella*, *Escherichia*, *Proteus* и *Enterobacterium* (на среде Левина), *Bacillus* и *Enterococcus* (на питательном агаре).

При анализе качественного состава микрофлоры эффлюента «Дображиватель» по срокам посева, встречаются все обнаруженные нами колонии микроорганизмов, меняется только их количество. Все определённые нами микроорганизмы являются факультативными анаэробами и в процессе метаболизма образуют кислоты и выделяют газ.

3.3 Статистическая обработка цифровых данных

3.3.1 Обработка цифровых данных методом дисперсионного анализа

На основании исходных данных по количеству колоний КМАиФАНМ, выросших в чашках Петри, в программе Microsoft Office Excel 2007 с помощью описательной статистики (метод дисперсионного анализа) нами были вычислены следующие параметры: среднее значение, стандартная ошибка, дисперсия и стандартное отклонение.

Среднюю арифметическую вычисляли по формуле:

$$M = \sum V/n ;$$

где M – средняя арифметическая; \sum - знак суммирования; V – дата, результат первичного измерения признака у каждого объекта в исследуемой группе; n – число объектов в группе.

C – дисперсия, сумма квадратов:

$$C = \sum (V - M)^2 ;$$

где C – дисперсия, сумма квадратов; \sum - знак суммирования; V – дата, результат первичного измерения признака у каждого объекта в исследуемой группе; M – средняя арифметическая.

δ – среднее квадратичное отклонение:

$$\delta = \sqrt{C / (n - 1)} ;$$

где δ – среднее квадратичное отклонение; C – дисперсия, сумма квадратов; n – число объектов в группе.

Ошибка средней арифметической:

$$m = \delta / \sqrt{n} ;$$

где m - ошибка средней арифметической; δ – среднее квадратичное отклонение; n – число объектов в группе.

В соответствии с числом степеней свободы, рассчитываемой по формуле:

$$v = n - 1 ;$$

Где v - число степеней свободы; n – число объектов в группе.

Общая численность КМАиФАНМ в эффлюенте «Дображиватель» по срокам посева (КОЕ/ г).

разбавление	сроки	°С	среднее	Стандартная ошибка	Дисперсия	Стандартное отклонение
1*10 ⁶	13.02.18	25	15,6	1,43	8,24	3,21
		34	22,2	1,9	13,76	4,14
	14.02.18	25	77,8	40,1	66,56	9,12
		34	89	3,6	50,8	7,96
	15.02.18	25	192,8	3,4	45,76	7,56
		34	267	15,5	955,6	34,56
	3.05.18	25	14,2	1,8	13,36	4,08
		34	18,4	1,9	13,84	4,15
	4.05.18	25	89,2	5,5	120,16	12,25
		34	135,6	13,1	689,04	29,34
	5.05.18	25	214,6	10,5	442,64	23,52
		34	256,8	20,5	1680,16	45,82

Расчет количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (далее КМАиФАНМ) в 10 г эффлюента производили следующим образом: среднее значение микроорганизмов из первого разведения делили на степень разведения и на 0,1 мл.(проба для посева).

КМАиФАНМ (КОЕ/г) эффлюента «Дображиватель» в разведении 1:10⁶ составило:

$$A_1 = 15,6 / (0,000001 \times 0,1) = 15,6 \times 10^7; A_2 = 22,2 / (0,000001 \times 0,1) = 22,2 \times 10^7;$$

$$A_3 = 77,8 / (0,000001 \times 0,1) = 77,8 \times 10^7; A_4 = 89 / (0,000001 \times 0,1) = 89 \times 10^7;$$

$$A_5 = 192,8 / (0,000001 \times 0,1) = 192,8 \times 10^7; A_6 = 267 / (0,000001 \times 0,1) = 267 \times 10^7;$$

$$A_7 = 14,2 / (0,000001 \times 0,1) = 14,2 \times 10^7; A_8 = 18,4 / (0,000001 \times 0,1) = 18,4 \times 10^7;$$

$$A_9 = 89,2 / (0,000001 \times 0,1) = 89,2 \times 10^7; A_{10} = 135,6 / (0,000001 \times 0,1) = 135,6 \times 10^7;$$

$$A_{11} = 214,6 / (0,000001 \times 0,1) = 214,6 \times 10^7; A_{12} = 256,8 / (0,000001 \times 0,1) = 256,8 \times 10^7;$$

Таблица 3.3.1.2.

Общая численность БГКП в эффлюенте «дображиватель» по срокам посева

разбавление	сроки	°С	среднее	Стандартная ошибка	Дисперсия	Стандартное отклонение
1*10 ⁶	13.02.18	25	5,8	1,8	12,56	3,96
		34	11,2	1,9	14,96	4,32
	14.02.18	25	115	7,0	196,4	15,67
		34	157,8	6,2	153,76	13,86
	15.02.18	25	187,8	5,8	135,36	13,00
		34	265,8	11,9	570,96	26,71
	3.05.18	25	22,2	2,4	22,16	5,26
		34	32,4	3,02	36,64	6,76
	4.05.18	25	84,8	7,6	232,56	17,04
		34	142,2	10,5	442,96	23,53
	5.05.18	25	206,4	8,3	272,64	18,46
		34	313,8	15,6	978,96	34,98

Расчет количества бактерий группы кишечной палочки (далее БГКП) в 10 г эфлюента производили следующим образом: среднее значение микроорганизмов из первого разведения делили на степень разведения и на 0,1 мл.

БГКП (КОЕ/г) эфлюента «Дображиватель» в разведении $1:10^6$ составило:

$$A_1 = 5,8 / (0,000001 \times 0,1) = 5,8 \times 10^7; A_2 = 11,2 / (0,000001 \times 0,1) = 11,2 \times 10^7;$$

$$A_3 = 115 / (0,000001 \times 0,1) = 115 \times 10^7; A_4 = 157,8 / (0,000001 \times 0,1) = 157,8 \times 10^7;$$

$$A_5 = 187,8 / (0,000001 \times 0,1) = 187,8 \times 10^7; A_6 = 256,8 / (0,000001 \times 0,1) = 256,8 \times 10^7;$$

$$A_7 = 22,2 / (0,000001 \times 0,1) = 22,2 \times 10^7; A_8 = 32,4 / (0,000001 \times 0,1) = 32,4 \times 10^7;$$

$$A_9 = 84,8 / (0,000001 \times 0,1) = 84,8 \times 10^7; A_{10} = 142,2 / (0,000001 \times 0,1) = 142,2 \times 10^7;$$

$$A_{11} = 206,4 / (0,000001 \times 0,1) = 206,4 \times 10^7; A_{12} = 313,8 / (0,000001 \times 0,1) = 313,8 \times 10^7.$$

3.3.2 Обработка цифровых данных разностным методом

Для обработки данных разностным методом мы использовали результаты из последнего разведения ($1:10^6$). Таким образом, мы сравнивали данные по датам одного типа эфлюента. Достоверность различий определяли по критерию Стьюдента ($p < 0,05$).

Таблица 3.3.2.1.

Обработка разностным методом данных, полученных при вычислении КМАиФАНМ (КОЕ/г), в разведении 1:10⁶ на МПА, эффлюента «Дображиватель» по дням инкубации при температуре 25⁰С.

1 день инкубации		d	d-d _{cp}	(d-d _{cp}) ²	Sd (1-2)	t _{фактор} (1-2)
13.02.18	3.05.18					
12	11	1	-0,4	0,16	1,21	1,16
16	12	4	2,6	6,67		
13	11	2	0,6	0,36		
20	17	3	1,6	2,56		
17	20	-3	-4,4	19,36		
X _{cp1} =15,6	X _{cp2} =14,2	d _{cp} =1,4	∑=0	∑(d-d _{cp}) ² = 29,11		
2 день инкубации		d	d-d _{cp}	(d-d _{cp}) ²	Sd (1-2)	t _{фактор} (1-2)
14.02.18	4.05.18					
70	75	-5	6,4	40,96	4,27	2,67
68	87	-19	-7,6	57,76		
83	81	2	13,4	179,56		
78	98	-20	-8,6	73,96		
90	105	-15	-3,6	12,93		

$X_{cp1}=77,8$	$X_{cp2}=89,2$	$d_{cp} = -11,4$	$\Sigma=0$	$\Sigma(d-d_{cp})^2=365,2$		
3 день инкубации		d	d-d _{cp}	(d-d _{cp}) ²	Sd (1-2)	t _{фактор} (1-2)
15.02.18	5.05.18					
193	189	4	25,8	665,64	11,78	1,85
203	198	5	26,8	718,24		
182	211	-29	-7,2	51,84		
195	227	-32	-10,2	104,04		
191	248	-57	-35,2	1239,04		
$X_{cp1}=192,8$	$X_{cp2}=214,6$	$d_{cp}=-21,8$	$\Sigma=0$	$\Sigma(d-d_{cp})^2=2778,8$		

Таблица 3.3.2.2.

Обработка разностным методом данных, полученных при вычислении КМАиФАНМ (КОЕ/г), в разведении 1:10⁶ на МПА, эффлюента «Дображиватель» по дням инкубации при температуре 34⁰С.

1 день инкубации		d	d-d _{cp}	(d-d _{cp}) ²	Sd (1-2)	t _{фактор} (1-2)
13.02.18	3.05.18					
16	12	4	0,2	0,04		
20	18	2	-1,8	3,24		
25	21	4	0,2	0,04		

24	18	6	2,2	4,84	0,66	5,75
26	23	3	-0,8	0,64		
$X_{cp1}=22,2$	$X_{cp2}=18,4$	$d_{cp}=3,8$	$\Sigma=0$	$\Sigma(d-d_{cp})^2=8,8$		
2 день инкубации		d	d-d _{cp}	(d-d _{cp}) ²	Sd (1-2)	t _{фактор} (1-2)
14.02.18	4.05.18					
78	98	-20	26,6	707,56	9,84	4,74
85	117	-32	14,6	213,16		
89	135	-46	0,6	0,36		
95	158	-63	-16,4	268,96		
98	170	-72	-25,4	645,16		
$X_{cp1}=89$	$X_{cp2}=135,6$	$d_{cp}=-46,6$	$\Sigma=0$	$\Sigma(d-d_{cp})^2=1835,2$		
3 день инкубации		d	d-d _{cp}	(d-d _{cp}) ²	Sd (1-2)	t _{фактор} (1-2)
15.02.18	5.05.18					
213	195	18	7,8	60,84	6,48	1,57
258	228	30	19,8	392,04		
271	261	10	-0,2	0,04		
293	299	-6	-16,2	262,44		
300	301	-1	-11,2	125,44		

$X_{cp1}=267$	$X_{cp1}=256,8$	$d_{cp}= 10,2$	$\Sigma=0$	$\Sigma(d-d_{cp})^2=840,8$		
---------------	-----------------	----------------	------------	----------------------------	--	--

Таблица 3.3.2.3.

Обработка разностным методом данных, полученных при вычислении БГКП (КОЕ/г), в разведении 1:10⁶ на МПА, эффлюента «Дображиватель» по дням инкубации при температуре 25^oС.

1 день инкубации		d	d-d _{cp}	(d-d _{cp}) ²	Sd (1-2)	t _{фактор} (1-2)
13.02.18	3.05.18					
3	13	-10	6,4	40,96	2,42	6,77
1	24	-23	-6,6	43,56		
8	25	-17	-0,6	0,36		
11	23	-12	4,4	19,36		
6	26	-20	-3,6	12,96		
$X_{cp1}=5,8$	$X_{cp1}=22,2$	$d_{cp}=-16,4$	$\Sigma=0$	$\Sigma(d-d_{cp})^2=117,2$		
2 день инкубации		d	d-d _{cp}	(d-d _{cp}) ²	Sd (1-2)	t _{фактор} (1-2)
14.02.18	4.05.18					
96	72	24	-6,2	38,44		
101	68	33	2,8	7,84		
120	81	39	8,8	77,44		

127	93	34	3,8	14,44	3,34	9,04
131	110	21	-9,2	84,64		
$X_{cp1}=115$	$X_{cp2}=84,8$	$d_{cp}= 30,2$	$\Sigma=0$	$\Sigma(d-d_{cp})^2=$ 222,8		
3 день инкубации		d	d-d _{cp}	(d-d _{cp}) ²	Sd (1-2)	t _{фактор} (1-2)
15.02.18	5.05.18					
169	186	-17	1,6	2,56	5,41	3,44
187	194	-7	11,6	134,56		
199	206	-7	11,6	134,56		
183	212	-29	-10,4	108,16		
201	234	-33	-14,4	207,36		
$X_{cp1}=187,8$	$X_{cp2}=206,4$	$d_{cp}=-18,6$	$\Sigma=0$	$\Sigma(d-d_{cp})^2=$ 587,2		

Таблица 3.3.2.4.

Обработка разностным методом данных, полученных при вычислении БГКП (КОЕ/г), в разведении 1:10⁶ на МПА, эффлюента «Дображиватель» по дням инкубации при температуре 34⁰С.

1 день инкубации		d	d-d _{cp}	(d-d _{cp}) ²	Sd (1-2)	t _{фактор} (1-2)
13.02.18	3.05.18					

4	25	-21	0,2	0,04	2,69	7,88
11	42	-31	-9,8	96,04		
14	35	-21	0,2	0,04		
15	33	-18	3,2	10,24		
12	27	-15	6,2	38,44		
$X_{cp1}=11,2$	$X_{cp2}=32,4$	$d_{cp}=-21,2$	$\Sigma=0$	$\Sigma(d-d_{cp})^2=144,8$		
2 день инкубации		d	d-d _{cp}	(d-d _{cp}) ²	Sd (1-2)	t _{фактор} (1-2)
14.02.18	4.05.18					
144	114	30	14,4	207,36	12,25	1,27
149	147	2	-13,6	184,96		
156	153	3	-12,6	158,76		
180	124	56	40,4	1632,16		
160	173	-13	-28,6	817,96		
$X_{cp1}=157,8$	$X_{cp2}=142,2$	$d_{cp}=15,6$	$\Sigma=0$	$\Sigma(d-d_{cp})^2=3001,2$		
3 день инкубации		d	d-d _{cp}	(d-d _{cp}) ²	Sd (1-2)	t _{фактор} (1-2)
15.02.18	5.05.18					
257	275	-18	30	900		

240	290	-50	-2	4		
245	303	-58	-10	100		
285	348	-63	-15	225		
302	353	-51	-3	9		
$X_{cp1}=265,8$	$X_{cp2}=313,8$	$d_{cp}=-48$	$\Sigma=0$	$\Sigma(d-dcp)^2=$ 1238		

Проанализировав полученные данные, и пользуясь правилом: если $t_{\phi} \geq t_{\tau}$, можно с уверенностью сказать, что разность между вариантами существенна, тогда сам собой напрашивается вывод, что при уровне вероятности $P_{0,95}$ и степени свободы 8, между датами выборок разница - существенная.

3.4 Видовое определение микроорганизмов выделенных в чистую культуру

Определив микрофлору эффлюента по морфологическим признакам, мы выделили несколько культур, преобладающих по количеству колоний на чашку Петри, в чистую культуру, после чего строго соблюдая методику проведения биохимического теста ENTEROtest 24 N нам удалось выявить принадлежность культур к видам: *Escherichia coli* с достоверностью 99,56% и *Proteus vulgaris* с достоверностью 80%, что позволяет считать проведённый эксперимент удавшимся (см. рис 3.4.1).

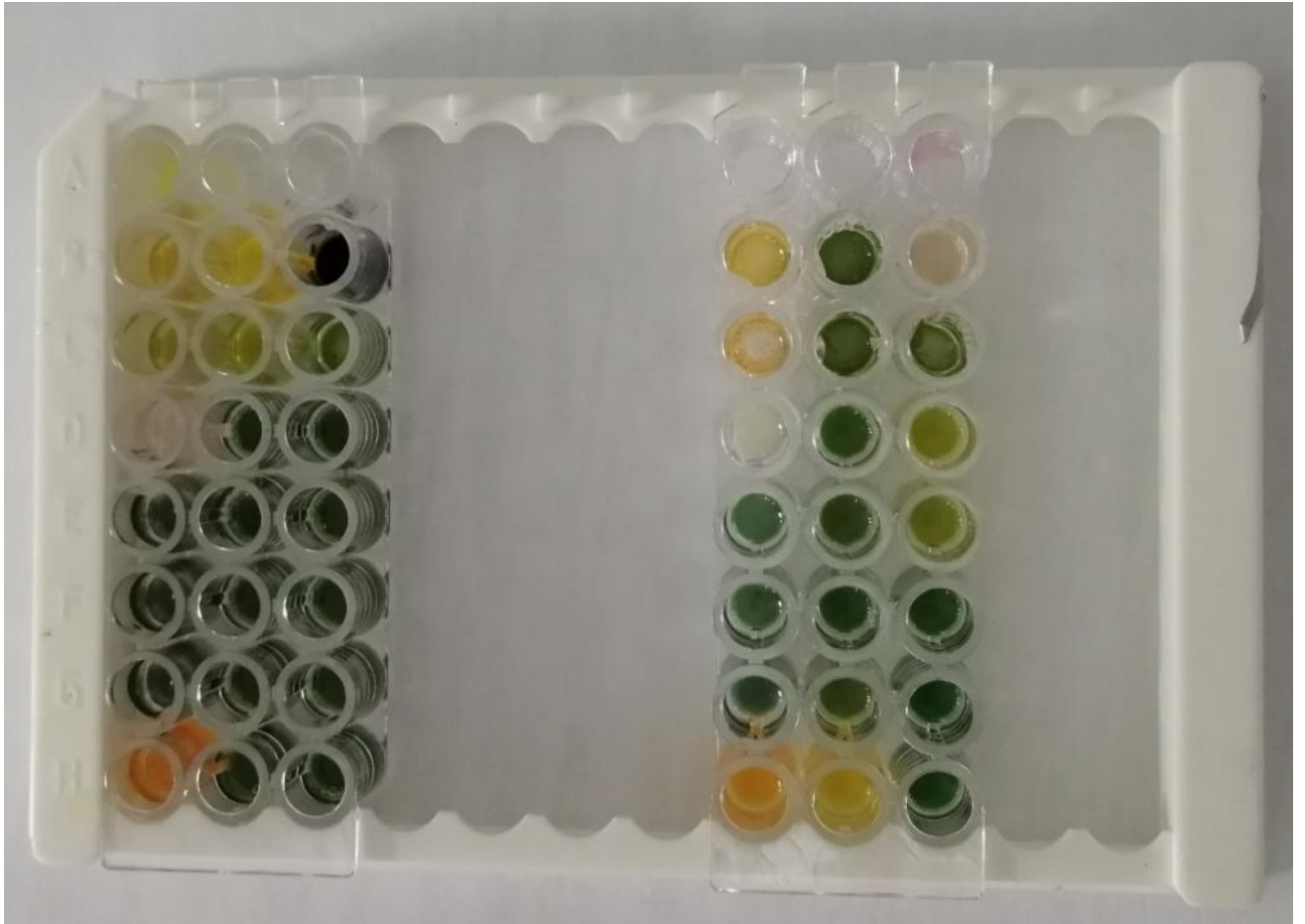


Рис. 3.4.1. Биохимический тест на определение микроорганизмов до вида.

3.5 Сравнение интенсивности протекания качественной реакции

3.5.1 Данные полученные в ходе проведения реакции на сахаролитическую активность

Таблица 3.5.1.1.

Сахаролитическая активность при различных углеводах.

Наименование углевода	Оптическая плотность		
	До заражения	После заражения (инкубация 24 часа)	
		среднее значение	
		<i>Escherichia coli</i>	<i>Proteus vulgaris</i>
Сахароза	0,21	0,30±0,01	0,27±0,003
Глюкоза	0,11	0,19±0,01	0,16±0,01
Лактоза	0,11	0,18±0,01	0,19±0,003
Фруктоза	0,16	0,14±0,01	0,17±0,003
Мальтоза	0,14	0,21±0,01	0,15±0,003
Контроль	0,8		

Таблица 3.5.1.2.

Качественный анализ сахаролитической активности микроорганизмов.

Вид микроорганизмов	контроль	сахароза	глюкоза	лактоза	фруктоза	мальтоза
<i>Escherichia coli</i>	–	–	КГ	КГ	–	К
<i>Proteus vulgaris</i>	–	К	*)	–	–	*)

Условные обозначения: К – образование кислоты; Г – образование газа; «–» – отсутствие реакции; *) – слабая реакция.

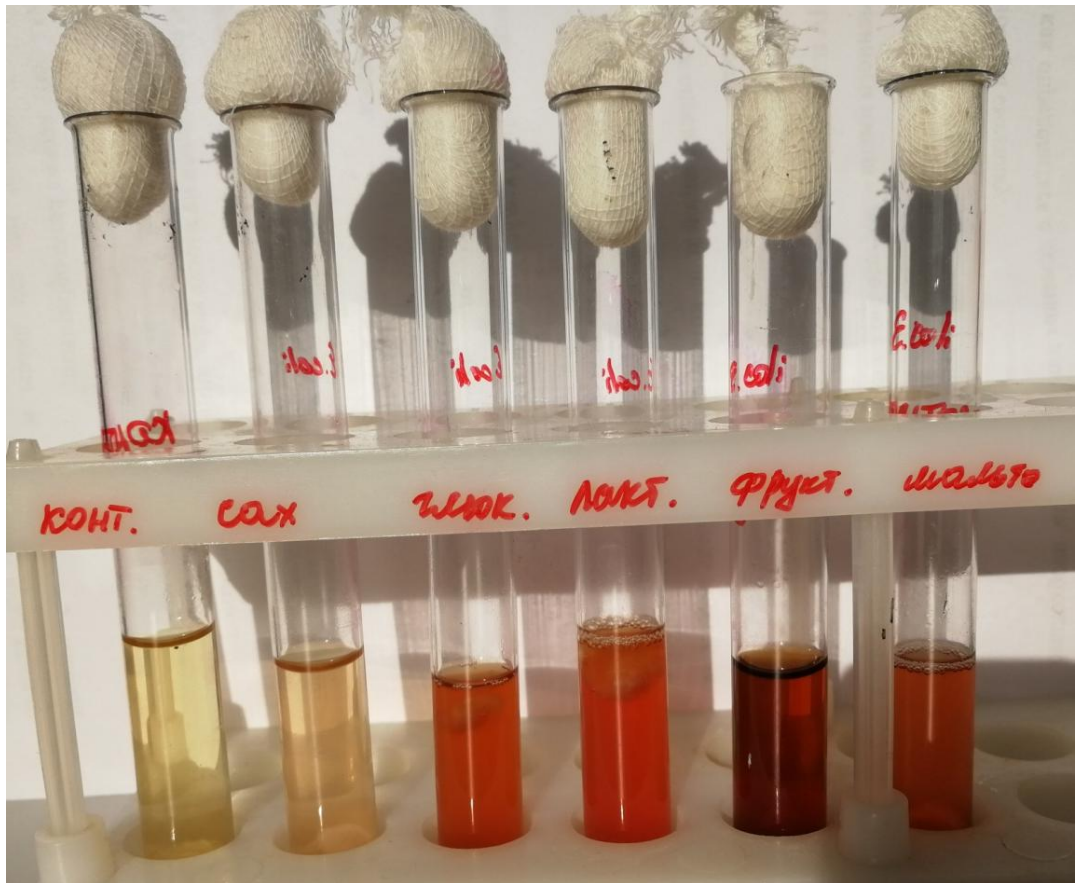


Рис. 3.5.1.1. Сахаролитическая активность *Escherichia coli*.

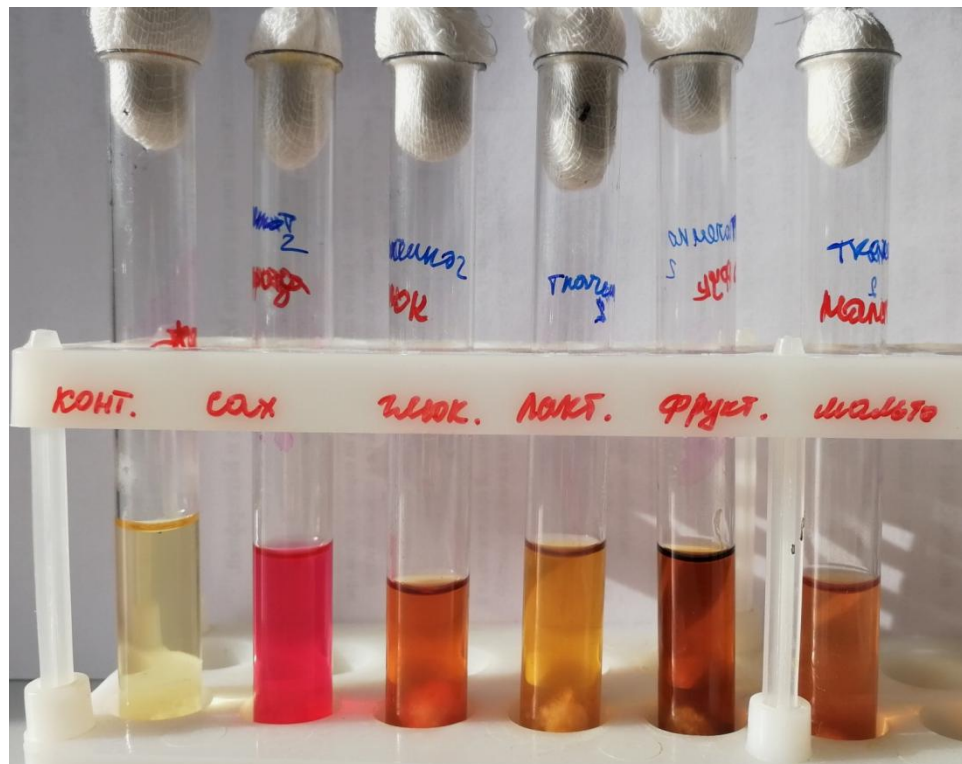


Рис. 3.5.1.2. Сахаролитическая активность *Proteus vulgaris*.

3.5.2 Данные полученные в ходе проведения реакции на протеолитическую активность

Таблица 3.5.2.1.

Интенсивность протекания протеолитической реакции с использованием суспензии микроорганизмов в различных разведениях.

Вид микроорганизмов	Оптическая плотность суспензии		
	0,5 мг/мл	0,3 мг/мл	0,1 мг/мл
<i>Escherichia coli</i>	2	1	1
<i>Proteus vulgaris</i>	1	1	1

Условные обозначения: «3» – наличие активности; «1» – отсутствие активности; «2» – слабая активность.

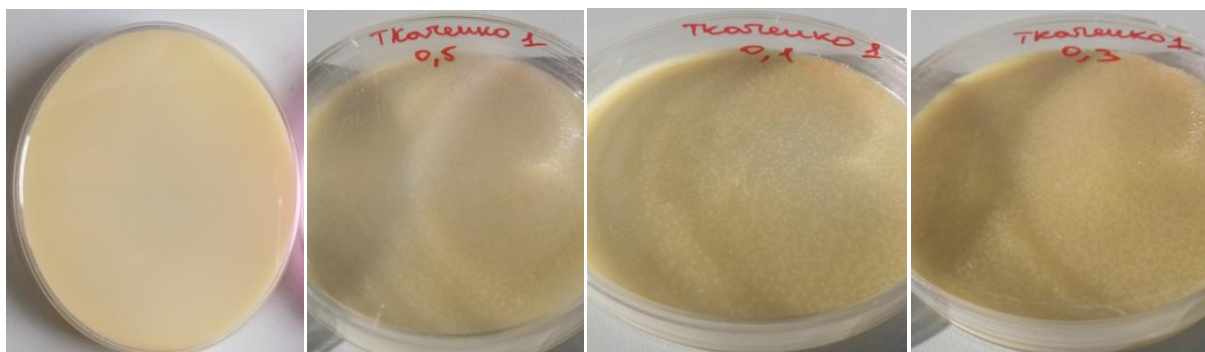


Рис.3.5.2.1. Протеолитическая активность *Escherichia coli*.

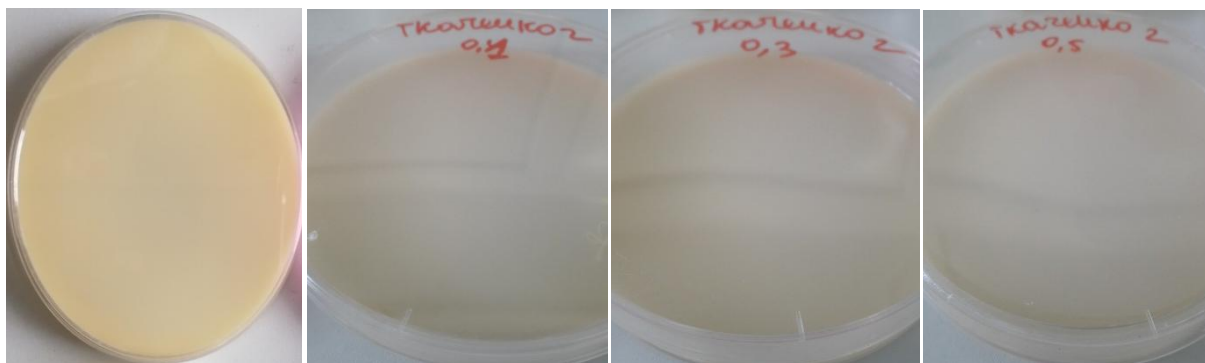


Рис. 3.5.2.2. Протеолитическая активность *Proteus vulgaris*.

3.5.3 Данные полученные в ходе проведения реакции на каталазную активность

Таблица 3.5.3.1.

Каталазная активность при разной концентрации H_2O_2 .

Вид микроорганизмов	Концентрация H_2O_2		
	1%	0,5%	0,1%
<i>Escherichia coli</i>	5	4	2
<i>Proteus vulgaris</i>	5	4	2

Балльная оценка протекания реакции:

- «5» – высокая интенсивность;
- «4» – интенсивность;
- «3» – средняя интенсивность;
- «2» – слабая интенсивность;
- «1» – очень слабая интенсивность.

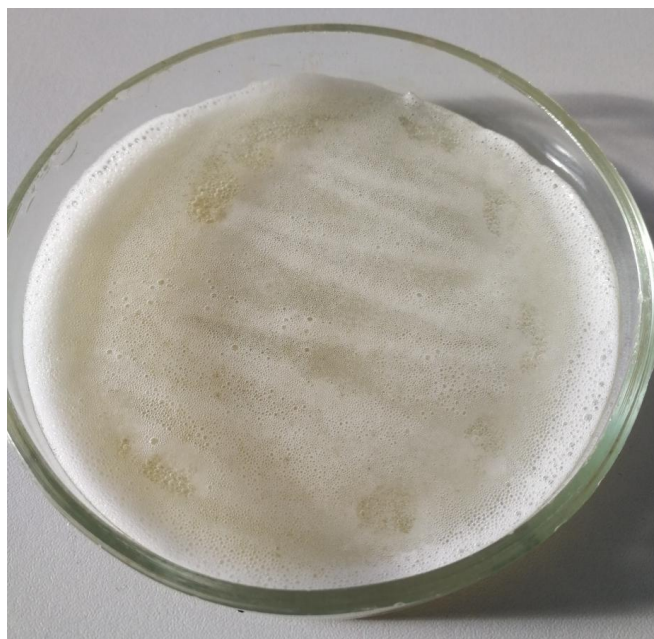


Рис.3.5.3.1. Каталазная активность *Escherichia coli*.

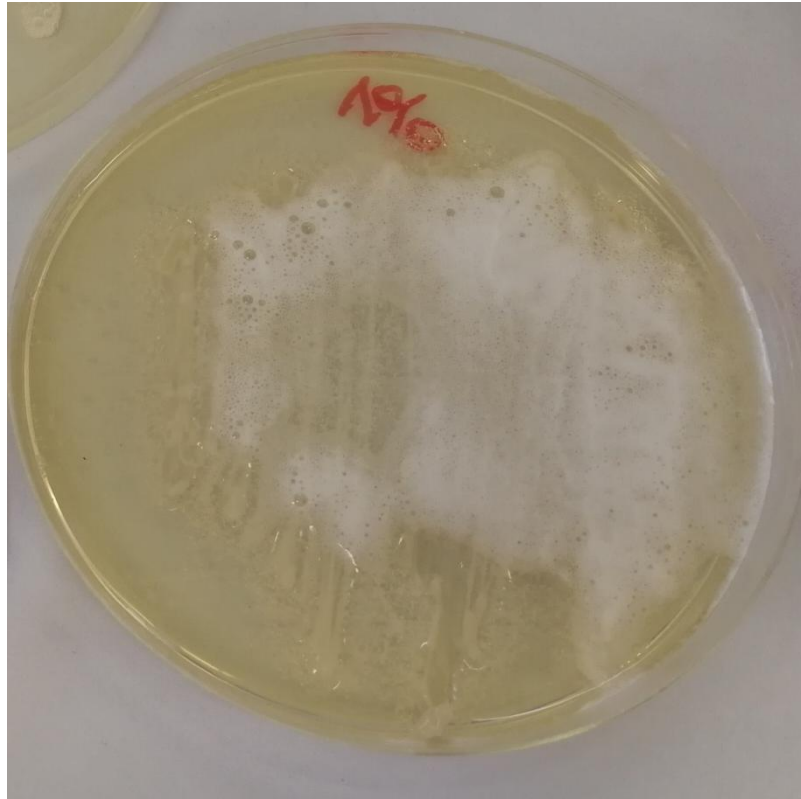


Рис. 3.5.3.2. Катазная активность *Proteus vulgaris*

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За время выполнения магистерской диссертации, была изучена и проанализирована научная и методическая литература, публицистика по заданной теме: иностранные и отечественные источники, глубоко изучена технология переработки сырья в биогазовых установках, условия получения целевых и побочных продуктов.

Способ утилизации отходов сельскохозяйственной промышленности с помощью биогазовых станций характеризуется экологичностью и безотходностью производственного процесса, высокой рентабельностью с точки зрения потребления и выработки тепло- и электроэнергии; газа, попутного производства органоминеральных удобрений, характеризующихся высоким содержанием питательных элементов, легко усвояемых растениями.

Помимо этого, достоверно известно, что такие удобрения отличаются отсутствием семян сорняков, приводящих не только к потерям урожайности, но и дополнительной обработке пестицидами; отсутствием патогенной микрофлоры. Применяя такое удобрение, можно достигнуть хороших показателей по снижению фитопатогенной нагрузки на почву, уменьшить объемы потребляемых минеральных удобрений за счёт стойкости внесенного эффлюента к вымыванию из почвы питательных элементов, а также максимального сохранения и накопления азота.

Поскольку зарубежный опыт применения данной технологии показал высокую эффективность, то и на территории нашей страны ведется ее активное внедрение, строятся и уже функционируют десятки станций, однако потребность в биогазовых станциях оценивается в 20 тысяч предприятий. В связи с интенсификацией производства сельскохозяйственной промышленности, очевидно, вырастет и отход. При использовании анаэробного сбраживания, применяемого в биогазовых установках, удастся достигнуть и значительных объемов сброженных продуктов, что в свою

очередь даст необходимость изучать влияние эффлоента на свойства почвы, качество возделываемых культур и урожайность.

В процессе работы, удалось собрать материалы, которые можно использовать при разработке практических рекомендаций по корректировке видового состава «переработчиков», либо соотношения компонентов субстрата с целью повышения продуктивности биогазовой установки, что повысит эффективность производственного процесса. Кроме того, результаты исследования планируется использовать в разработке методических пособий по направлениям подготовки «биотехнология» и «микробиология», что несомненно, могло бы стать частью подготовки высококвалифицированных специалистов для работы на данных предприятиях.

Таким образом, в ходе проделанной работы сделаны следующие выводы:

1. С помощью микроскопического и микробиологического метода анализа мы определили состав микрофлоры в эффлоенте взятом в качестве пробы с биогазовой станции.
2. В результате серии экспериментов в эффлоенте были обнаружены микроорганизмы таких видов, как *Escherichia coli* и *Proteus vulgaris*.
3. Сахаролитическая активность исследованных микроорганизмов отличается значительной разнородностью, максимальная активность *Escherichia coli* была зарегистрирована в опыте с такими сахарами как глюкоза, лактоза и частично мальтоза, а у *Proteus vulgaris* с сахарозой, глюкозой и слабая - с мальтозой.
4. Протеолитическая активность исследованных микроорганизмов не значительно отличается разнородностью, из-за практически отсутствующего потребления казеина в жизнедеятельности *Escherichia coli* и *Proteus vulgaris*.

5. Каталазная активность исследованных микроорганизмов не отличается ни у *Escherichia coli*, ни у *Proteus vulgaris*, поскольку вступая в реакцию с разной концентрацией H_2O_2 , проявляет признаки наличия фермента каталазы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баадер Б., Доне Е., Бренндерфер М. Биогаз. Теория и практика/ Перевод с нем. и предисловие Серебряный М.И., –М.: Колос, 1982. –148 с.
2. Германович В., Турилин А. - Альтернативные источники энергии. Практические конструкции по использованию энергии ветра, солнца, воды, земли, биомассы. – СПб.: Наука и Техника, 2011.
3. Дайнеко А.А., Суслов Д.Ю. Развитие биогазовых технологий в РФ/ материалы VI Международной студенческой электронной научной конференции «Студенческий научный форум» 15 февраля – 31 марта 2014 года.
4. Звягинцев Д.Г. Почва и микроорганизмы. М.Изд-во МГУ. 1987. 255 с.
5. Зенова Г.М Степанов А.Л Лихачева А.А Манучарова Н.А. Практикум по биологии почв: Учебное пособие.М.: МГУ,2002.)
6. Василев Р.Г. Биотопливо: Биодизель, биоэтанол, биогаз/ Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. – 2007.Т.3. - №№ 1-3.–33 с.
7. Волова, Т. Г. Введение в биотехнологию. Версия 1.0 [Электронный ресурс]: электрон. учеб. пособие / Т. Г. Волова. – Электрон. дан. (2 Мб). – Красноярск: ИПК СФУ, 2008. – 183 с.
8. Виноградова А.В. Биотехнология топлива/ Учеб. пособие / А.В. Виноградова, Г.А. Козлова, Л.В. Аникина. – Пермь: Изд-во Перм. гос. техн. ун-та, 2008. – 212 с. – ISBN 978-5-398-00077-1.
9. Иванов Д.В. Биогеохимическое образование и окисление биогаза в техногенных грунтах по данным изотопно-химических исследований/ автореферат диссертации на соискание учёной степени кандидата геолого-минералогических наук. – Раменское, 1998. – 99 с.
10. Иорданский А. Бесплатный биогаз, или Биотехнология для свинофермы/ Журнал «Химия и жизнь» № 1, 1988. – 96 с.

11. Корзникова М.В. Стратегические аспекты управления отходами животноводства и птицеводства в целях минимизации негативного воздействия на окружающую среду / Автореферат на соискание ученой степени кандидата биологических наук. – М., 2006. – 137 с.
12. Костромин Д.В. Анаэробная переработка органических отходов животноводства в биореакторе с барботажным перемешиванием/ Автореферат на соискание ученой степени кандидата технических наук. – М., 2010. – 17 с.
13. Моисейченко В.Ф. Основы научных исследований в агрономии/ Моисейченко В.Ф., Трифонова М.Ф., Заверюха А.Х., Ещенко В.Е. – М.: Колос, 1996. – 336 с.
14. Микробиология биогазовых производств/ Настольная книга ООО «Альт Энерго», 2012. – 22 с.
15. Санжаровская М.И. Анаэробная переработка отходов для получения биогаза/ Реферативный журнал № 2. – М., 2009. – 381 с.
16. Санжаровская М.И. Газ и удобрения из биоотходов/ Реферативный журнал № 3. – М., 2008. – 650 с.
17. Сидыганов Ю. Н. Барботажное перемешивание в биореакторах анаэробного сбразивания / Ю. Н. Сидыганов, Д. Н. Шамшуров, Д. В. Костромин // Национальные приоритеты развития России: образование, наука, инновации: сб. тез. выступлений участников программы (3 – 6 марта 2008 года, г. Москва). – М., 2008. – 218-219 с.
18. Сидыганов Ю.Н. Интенсивная технология производства биогаза: монография / Ю.Н. Сидыганов, Д.В. Костромин, и др. – Йошкар-Ола: ПГТУ, 2013. – 331 с.
19. Сиротин А.А. Практикум по микробиологии/ А.А. Сиротин.- Белгород. 2007. – 78 с.
20. Скулачев В. П. Энергетика биологических мембран. М., 1989

21. Соуфер С., Заборски О. Биомасса как источник энергии/ - М.: Мир, 1985. – 368 с.
22. Тихонравов В.С. Ресурсосберегающие биотехнологии производства альтернативных видов топлива в животноводстве/ Научно-аналитический обзор. М.: ФГБНУ «Росинформагротех», 2011. – 52 с.
23. Эфендиев А.М. Биогаз. Технология и оборудование./ Федер. гос. бюджет. образоват. учреждение высш. проф. образования "Сарат. гос. аграр. ун-т им. Н. И. Вавилова". Саратов, 2013. – 250 с.
24. Эдер Б., Шульц Х. Биогазовые установки. Практическое пособие/ По изд. 1996, на нем. (Biogas-Praxis. Grundlagen, Planung, Anlagenbau, Beispiele, Wirtschaftlichkeit), Ökobuch Verlag u. Versand (1996-05-22). Перевод с немецкого выполнен компанией Zorg Biogas в 2011 г. Под научной редакцией И. А. Реддих.
25. Abubaker, J. Biogas residues as fertilizers – Effects on wheat growth and soil microbial activities / J. Abubaker, K. Risberg, M. Pell // Appl. Energy.– 2012.– N99.– P. 126–134
26. Agdag, O.N. and Sponza, D.T. (2004) Effect of aeration on the performance of a simulated landfilling reactor stabilizing municipal solid waste. Journal of Environmental Science and Health Part A - Toxic and Hazardous Substances and Environmental Engineering. 39: 2955-2972.
27. Altawell N. The Selection Process of Biomass Materials for the Production of Bio-Fuels and Co-firing. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey., 2014. XXII, 351 p. — ISBN 978-1-118-54266-8 (hardback) — (IEEE Press Series on Power Engineering).
28. Bohn, I. Björnsson, L, Mathiasson B. (2006). The energy balance in farm scale anaerobic digestion of crop residues at 11-37°C. Process Biochemistry. 42:57-64.
29. Bräuer, S.L., Yashiro, E., Ueno, N.G., Yavitt, J.B. and Zinder, S.H. (2006). Characterization of acid-tolerant H₂/CO₂-utilizing methanogenic enrichment

- cultures from an acidic peat bog in New York State. *FEMS Microbial Ecology*. 57: 206-216.
30. Blaschek H.P., Ezeji T., Scheffran J. (eds.) *Biofuels from Agricultural Wastes and Byproducts*. Blackwell Publishing, John Wiley & Sons, 2010. 265 p. — ISBN 978-0-8138-0252-7.
31. Chaban, B., Ng, S.Y.S. and Jarell, K.F. (2006) Archaeal habitats – from the extreme to the ordinary. *Canadian Journal of Microbiology*. 52:73-116.
32. Chen, M. (1983) Adaptation of mesophilic anaerobic sewage fermentor populations to thermophilic temperatures. *Applied and Environmental Microbiology*. 45: 1271-1276.
33. Chen, Y., Cheng, J.J., Creamer, K.S. (2008). Inhibition of anaerobic digestion process: A review. *Bioresource Technology*. 99: 4044-4064.
34. Cirne, D.G., Lehtomäki, A., Björnsson, L. and Blackhall, L.L. (2007). Hydrolysis and microbial community analysis in two-stage anaerobic digestion of energy crops. *Journal of Applied Microbiology*. 103: 516-527.
35. Climehaga, M. A. and Banks, C. J. (2008). Anaerobic digestion of catering wastes: effect of micronutrients and retention time. *Water Science and Technology*. 57: 698-692.
36. Colberg, P.J. (1988). Anaerobic microbial degradation of cellulose, lignin, oligolignols, and monoaromatic lignin derivatives. *Biology of Anaerobic Microorganisms* (Zehnder. J.B. ed) John Wiley and Sons, Inc. (USA): 333-372.
37. Collins, G., McHugh, S., Connaughton, S., Enrich A.M., Kearney, A., Mahony, T., Madden, P., O'Flaherty, V. (2006). New low temperature applications of anaerobic wastewater treatment. *Journal of Environmental Science and Health Part A - Toxic and Hazardous Substances and Environmental Engineering*. 41: 881-895.
38. Dasonville, F. and Renault, P. (2002). Interactions between microbial processes and geochemical transformations under anaerobic conditions: a review. *Agronomie*. 22: 51-68.

39. Ding, S.Y., Xu, Q., Crowley, M., Zeng, Y., Nimlos, M., Lamed, R., Bayer, E.A. and Himmel, M.E. (2008). A biophysical perspective on the cellulosome: new prespective for biomass conversion. *Current Opinion in Biotechnology*. 19: 218-227.
40. Doi, R.H. (2008). Cellulases of mesophilic microorganisms. *Annual New York Academy of Sciences*. 1125: 267-279.
41. Dolfing, J. (1988) Acetogenic dehydrogenations. *Biology of Anaerobic Microorganisms* (Zehnder. J.B. ed) John Wiley and Sons, Inc. (USA): 417-468.
42. Drake, H.L. Gössner, A. and Daniel, S. (2008). Old acetogens, new light. *Annual New York Academy of Sciences*. 1125: 100-128.
43. Florencio, L., Jenicek, P., Field, J.A. and Lettinga, G. (1993). Effect of cobalt on the anaerobic degradation of methanol. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 75: 368-374.
44. Fuchs, G. (2008). Anaerobic metabolism of aromatic compounds. *Annual New York Academy of Sciences*. 1125: 82-99.
45. Garcia, J-L., patel, B.K.C. and Ollivier, B. (2000) Taxonomic, phylogenetic and ecological diversity of methanogenic archaea. *Anaerobe*. 6: 105-226.
46. Gottschalk, G. (1986). *Bacterial metabolism*. Springer Verlag New York Inc.
47. Gupta, R., Gupta, N. and Rathi, P. (2004). Bacterial lipases: and overview of production, purification and biochemical properties. *Applied Microbiology Biotechnology*. 64: 763-781.
48. Hattori, S. (2008). Syntrophic acetate oxidizing microbes in methanogenic environments. *Microbes and Environments*. 23: 118-127.
49. Jarrell, K.F. and Kalmokoff, M.L. (1988). Nutrial requirements of the methanogenic archaeobacteria. *Canadian Journal of Microbiology*. 34: 557-576.
50. Jarvis, Å., Nordberg, Å., Jarlsvik, T., Mathisen, B. and Svensson, B.H. (1997). Improvement of a grass-clover silage-fed biogas process by addition of cobalt. *Biomass and Bioenergy*. 12: 453-460.
51. Karakashev, D., Batstone, D.J., Trably, E., and Angelidaki, I. (2006). Acetate oxidation is the dominant methanogenic pathway from acetate in the

- absence of Methanosaetaceae. *Applied Environmental Microbiology*. 72: 5138-5141.
52. Lindorfer, H., Waltenberger, R., Köller, K., Braun, R. and Kirchmayr, R. (2008). New data on temperature optimum and temperature changes in energy crop digesters. *Bioresource Technology*. 99: 7011-7019.
53. Liu, Y. and Whitman, W.B. (2008). Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic archaea. *Annual New York Academy of Sciences*. 1125: 171-189.
54. Madigan, M.T. and Martinko, J.M. (2006). *Brock Biology of Microorganisms* (11th ed.). Pearson Education TLD. London
55. Mathrani, I.M., Boone, D.R., Mah, R.A., Fox, G.E. and Lau, P.P. (1988). *Methanohalophilus* 23 *zhilinae* sp. Nov., an alkaliphilic, halophilic methylotrophic methanogen. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 38: 139-142.
56. McInerney, M.J. (1988). Anaerobic hydrolysis and fermentation of fats and proteins. *Biology of Anaerobic Microorganisms* (Zehnder, J.B. ed) John Wiley and Sons, Inc. (USA): 373-415.
57. McInerney, M.J., Struchtmeier, C.G., Sieber, J. Mouttaki, H., Stams, A.J.M., Rohlin, L. and Gunsalus, R.P. (2008). Physiology, ecology, phylogeny, and genomics of microorganisms capable of syntrophic metabolism. *Annual New York Academy of Sciences*. 1125: 58-72.
58. Noah, M.M. and Wiegel, J. (2008). Life at extreme limits. The anaerobic halophilic alkalithermophiles. *Annual New York Academy of Sciences*. 1125: 44-57.
59. Nicholls D. G., Ferguson S.J. *Bioenergetics 3*. Amst., 2002.
60. Sosnowski, P. Kinetic investigations of methane co-fermentation of sewage sludge and organic fraction of municipal solid wastes / P. Sosnowski, A. Klepacz-Smolka, K. Kaczorek, S. Ledakowicz // *Biores. Technol.*– 2007.– N 99.– P. 5731–5737

61. Whitman, W.B., Bowen, T.L. and Boone, D.R. (2006). The methanogenic bacteria. The Prokaryotes: An evolving electronic resource for the microbiological community. Ed. M. Dworkin. Springer. New York.
62. Zehnder, J.B. (1988) Biochemistry and biogeochemistry of anaerobic habitats. Biology of Anaerobic Microorganisms (Zehnder. J.B. ed) John Wiley and Sons, Inc. (USA).
63. Zhang, Y., Zhnag, Z., Suzuki, K. and Maekawa, T. (2003). Uptake and mass balance of trace metals for methane producing bacteria. Biomass and Bioenergy. 25: 427-433.
64. Zinder, S.H. (1984). Microbiology of anaerobic conversion of organic wastes to methane: recent developments. ASM News. 50: 294-298.
Zinder, S.H. (1993). Physiological ecology of methanogenesis. I Methanogenesis: Ecology, Physiology, Biochemistry and Genetics (Ferry, J.G., ed.). New York, Chapman and Hall: 128-206.

Интернет-ресурсы:

65. <http://www.altenergo-nii.ru/projects/biogaz/>
66. <http://stroychik.ru/raznoe/proizvodstvo-biogaza>
67. <https://mikhed.ru/world/2015-08-Biogas-Powerplant-Luchki.html>
68. <http://rostechbio.ru/?p=347>
69. <https://works.doklad.ru/view/LA1Xkn-biu4/all.html>