

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

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ БАКТЕРИЙ РОДА *PROTEUS* В РАЗЛИЧНЫХ
РАСТИТЕЛЬНЫХ СУБСТРАТАХ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ПРИ
ПОЛУЧЕНИИ БИОГАЗА**

Магистерская диссертация
студента очной формы обучения
направления подготовки 06.04.01 Биология
магистерская программа Микробиология
2 года обучения группы 07001643
Линник Алексея Вячеславовича

Научный руководитель
доктор биологических наук,
профессор кафедры
биотехнологии и микробиологии
Батлуцкая И.В.

Рецензент
начальник лаборатории
биогазовой установки
ООО «АльтЭнерго»
Охримчук Д.П.

БЕЛГОРОД 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.....	5
1.1. Общая характеристика рода <i>Proteus</i>	5
1.2. Общая схема получения биогаза.....	9
1.3. Использование различных растительных питательных субстратов при получении биогаза.....	19
ГЛАВА 2. ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКАЯ ЧАСТЬ.....	42
2.1. Материалы исследования	42
2.2. Комплекс методов исследования.....	46
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	50
3.1. Исследование общей микробной заселенности субстрата.....	50
3.2. Выделение бактерий в чистую культуру.....	52
3.3. Определение до вида биохимическим тестом ENTEROtest 24...	52
ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ.....	54
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	56

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы значительно возросла заинтересованность в процессах производства биогаза. Что проявляется не только в возрастающем количестве планомерно строящихся биогазовых установок, но и в заинтересованности все большего числа фермеров, коммунальных хозяйств, предприятий, предпринимателей и частных хозяйств, которые внимательно наблюдают за развитием сектора экономики, связанного с биоэнергетикой, инновационного сектора развития современной экономики РФ.

Энергетическая отрасль уже также не относится с такой осторожностью к децентрализации производства благодаря строительству биогазовых установок. Для пищевой промышленности, гастрономии, больших ресторанов, учреждений общественного питания и предприятий по переработке пищевых отходов технология производства биогаза предоставляет шанс дешевой утилизации органических отходов и остатков продуктов питания в биогазовых установках с пользой для сельского хозяйства. Эта технология завоевывает также все больше сторонников среди людей, лично убедившихся в ее пользе для окружающей среды.

По-прежнему сохраняется актуальность определения видового состава микроорганизмов, перерабатывающих различные органические субстраты. Первичный качественный анализ (до вида) микрофлоры субстрата смешивающего резервуара биогазовой станции «Лучки» позволяет подойти к решению вопроса мониторинга динамики разнообразия микроорганизмов в различных органических субстанциях, используемых в технологии получения метана в условиях действующей БГС «Лучки». Подобные исследования целесообразно осуществлять планомерно, с учетом региональных особенностей и химического состава используемого субстрата. На БГС «Лучки» одними из основных компонентов субстрата являются боенские отходы и кукурузный силос – это и определяет исходный состав микрофлоры.

Таким образом, инновационность такого подхода уже создали условия для применения современных методов молекулярных исследований для определения видового состава микроорганизмов, задействованных в образовании биогаза.

Знание состава микрофлоры субстрата, используемого при получении биогаза значимо, особенно в период запуска биогазовых станций. Анализ литературы показал отсутствие единых технологий и схем запуска подобных станций. Отсутствие данных по видовому составу микрофлоры субстратов.

Бактерии рода *Proteus* играют огромную роль в переработке органики, ферментируя углеводы с образованием кислых продуктов. Расщепляют глюкозу с образованием кислоты и газа. Разные виды отличаются по ферментации углеводов, образованию индола, уреазы, сероводорода, орнитиндекарбоксилазы и другим признакам.

Цель исследования заключалась, прежде всего, в определении бактерий рода *Proteus* в различных растительных субстратах, используемых при получении биогаза.

Задачи исследования:

1. Изучить и выяснить роль бактерий рода *Proteus* в процессе получения биогаза.
2. Изучить стадию гидролиза как один из важнейших этапов получения биогаза.
3. Изучить разновидности растительных субстратов применяемых для получения биогаза.
4. Определить бактерии рода *Proteus* до вида, при помощи системы ENTEROtest 24.

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1. Общая характеристика рода *Proteus*

Proteus (Протей) впервые был выделен Хаузером в 1885 г. В мазках располагаются парно или цепочками, спор и капсул не образуют, подвижны. Капсул не имеют, факультативные анаэробы. Хорошо растет на обычных питательных средах. На МПА образует два вида колоний: в Н-форме колонии имеют вид «роения». Это типичная форма роста (сплошной рост), которая сопровождается неприятным гнилостным запахом. При неблагоприятных условиях (наличие в среде фенола, желчных солей) образует О-формы колоний, с ровными краями. Пигментов не образуют [69,58]. При росте на жидких средах дают равномерное помутнение. Род *Proteus* относится к семейству *Enterobacteriaceae* и включает следующие виды: *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Proteus myxofaciens*, *Proteus hauseri*, *Proteus penneri*.

Протеи обитают в кишечнике многих видов позвоночных и беспозвоночных животных, почве, сточных водах и разлагающихся органических остатках. Некоторые виды вызывают инфекции мочевыводящих путей у человека, пищевые токсикоинфекции, а также вторичные септические поражения у пациентов с ожогами и после хирургических вмешательств [6,70].

Морфология. Бактерии рода *Proteus* — полиморфные палочки размером 0,5—0,6X1,2—3 мкм, подвижные (перетрихи) грамотрицательные. Факультативные анаэробы. Могут встречаться кокко-видные и нитевидные формы. Спор и капсул не образуют, имеют перитрихально расположенные жгутики, пили и микрокапсулу. У большинства штаммов имеет место роение, приводящее к образованию концентрических зон или распространению в виде однородной пленки по влажной поверхности питательной среды [9]. Они хорошо растут на основных питательных средах. Факультативные анаэробы, хемоорганотрофы, обладающие окислительным и бродильным

типами метаболизма.

Метаболизм бактерии рода *Proteus* характеризуется отсутствием ферментации лактозы, сбраживанием глюкозы с образованием кислоты и газа, образованием сероводорода, расщеплением мочевины и др. Данные микроорганизмы содержат О-антиген (термостабильный) и Н-антиген (термолабильный). Штаммам протеуса присуща выраженная индивидуальность в антигенной структуре, что осложняет их серологическую классификацию и диагностику. Протеус относится к числу условно патогенных бактерий и может быть причиной токсикоинфекций, диспепсий и различных гнойных заболеваний. Для выделения и идентификации протеусов применяются те же питательные среды, что и при исследованиях на патогенную группу кишечных бактерий [14,75].

Культуральные свойства выражаются в том, что микроб хорошо культивируется на питательных средах. При посеве материала, содержащего палочку протея, в конденсационную воду свежескошенного агара (метод Шукевича) через несколько часов отмечается роение микроба, ползучий рост, в виде Н-формы (поверхность МПА покрывается тонкой прозрачной пленкой). Посев по методу Шукевича широко применяют в диагностических лабораториях при выделении палочки протея из объектов внешней среды и продуктов. На плотных углеводных средах (Эндо, Плоскирева) *Pr. morganii* дает прозрачные, округлые, «нероящиеся» О-формы колонии. На среде Плоскирева вокруг прозрачных колоний, обладающих характерным запахом, среда окрашивается в желтоватый цвет [31]. Более старшего возраста колонии нередко мутнеют, а их центр окрашивается в бурый цвет. Ферментативные свойства. Бактерии рода *Proteus* сбраживают глюкозу с выделением кислоты и газа, неферментируют лактозу и маннит, расщепляют мочевины. *Pr. vulgaris* и *Pr. mirabilis* обладают протеолитической способностью, разжижают желатин; выделяют *Pr. vulgaris* в отличие от *Pr. mirabilis* образует индол, сбраживает мальтозу. Ферментативные свойства микробов этой группы представлены [36,60].

Протеи растут на простых средах в широком диапазоне температур. Оптимальная рН -7,2 -7,4, температура - от +35 до 37 градусов Цельсия. Колонии протеев в О- форме округлые, полупрозрачные и выпуклые, Н- формы дают сплошной рост. Рост протеев сопровождается гнилостным запахом. Характерен феномен роения, Н- формы дают на МПА характерный ползучий рост в виде голубовато - дымчатой нежной вуали. При посеве по методу Шушкевича в конденсационную влагу свежескошенного МПА культура постепенно поднимается в виде вуали вверх по поверхности агара. На МПБ отмечают диффузное помутнение среды с густым белым осадком на дне [50]. На среде Плоскирева формируют блестящие прозрачные желтовато-розовые колонии (с подщелачиванием и пожелтением среды вокруг колоний). В качестве сред обогащения используют среды Мюллера, Кауфмана, 5% желчный бульон.

Антигенные свойства проявляются в том, что как и у других энтеробактерий, у протеев имеются О-, Н- и К- антигены. Соматические О- антигены термостабильны, жгутиковые Н- антигены термолабильны. Для серологической идентификации определяют структуру О- и Н- антигенов. У протеев ОХ имеется антигенное родство с риккетсиями. Это их свойство ранее применяли для серологической диагностики риккетсиозов.

Устойчивость к действию высоких положительных температур проявляется в том, что бактерии из рода *Proteus* погибают при 60°C в течение 1 ч, при 80°C — за 5 мин. *Proteus* устойчивы к низким температурам, переносят трехкратное попеременное замораживание и оттаивание. 1%-ный раствор фенола вызывает гибель протеев через 30 мин [56].

Изучение санитарно-показательного значения бактерий рода *Proteus* показало, что микроорганизмы этой группы, в частности вид *Pr. vulgaris*, в небольшом количестве встречается как в кишечнике человека и животного, так и во внешней среде. Он является возбудителем гнилостных процессов в природе. Вид *Pr. mirabilis* — обитатель кишечника человека и животных. В отличие от уже рассмотренных санитарно-показательных микроорганизмов

(бактерий группы кишечных палочек, энтерококков), палочки *Proteus* встречаются в кишечнике человека сравнительно в небольшом количестве (в 5—10% случаев); в кишечнике лошадей, крупного рогатого скота и других животных их обнаруживают чаще, особенно летом. Из вышеизложенного следует, что бактерии рода *Proteus* не имеют самостоятельного значения как показатели фекального загрязнения [32]. Они не удовлетворяют основным требованиям санитарно-показательных микроорганизмов. Тем не менее, бактерии рода *Proteus* имеют определенное санитарно-показательное значение, так как обнаружение большого количества *Pr. vulgaris* в почве, воде свидетельствует о содержании в них и разрушении органических веществ животного происхождения. При загрязнении объектов внешней среды фекальными стоками, как правило, выявляют *Pr. mirabilis*.

Как санитарно-показательные микроорганизмы бактерии рода *Proteus* вместе с *E. coli*, энтерококком, *Cl. perfringens* и бактериофагом применяют для санитарно-гигиенической оценки почвы, воды открытых водоемов [26].

Обнаружение протей в пищевых продуктах свидетельствует о гнилостном процессе. Степень обсеменения мясных продуктов (мяса, колбас и др.) бактериями рода *Proteus* устанавливают по титру протей. Для этого в конденсационную воду свежескошенного агара вносят по 0,1-мл десятичных разведений исследуемого материала. Посевы выращивают при 37°C в течение 18—48 ч. Титр определяют по наименьшему количеству засеянного продукта, в котором обнаружен рост палочки протей в виде H-формы [4,17].

Лабораторная диагностика бактериальной обсеменности среды показывает, что для определения используют дифференциально - диагностические среды (Плоскирева), среды обогащения и МПА по методу Шушкевича. Чистую культуру идентифицируют по биохимическим свойствам, серологическая дифференциация проводится в РА живой и гретой культуры с поливалентными и моновалентными O- и H- сыворотками. Самый простой метод определения - по феномену роения. Среди биохимических методов - просветление и побурение сред с тирозином и

триптофаном характерно для бактерий группы *Proteus-Providencia-Morganella*. Важный дифференциальный признак протей - способность дезаминировать фенилаланин до фенилпировиноградной кислоты, в присутствии $FeCl_2$ это приводит к окрашиванию среды в зеленый цвет. Дифференциальный признак, отличающий протей от *Providencia* и *Morganella* - покраснение лизино - железного агара, обусловленное дезаминированием лизина и образованием кетокилот [23,71].

1.2. Общая схема получения биогаза

Биогаз является продуктом обмена веществ бактерий, образующийся вследствие разложения ими органического субстрата. Процесс разложения можно разделить на 4 этапа в каждом из которых участие принимают много разных групп бактерий [52,53].

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.

Этот этап очень важен, поскольку большие органические молекулы, попросту слишком велики, чтобы быть непосредственно поглощаемыми и могли использоваться микроорганизмами в качестве источника пищи. [28,7]

Для достижения биодеградаций, 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.

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. [66]

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

Существуют различные ферменты для деструкции сахаров, белков, жиров. В таблице 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 [12,20].

Таблица 1.1.

Некоторые важные группы гидролитических ферментов и их функции

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

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.

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; а в процессе ферментации активны микроорганизмы и других видов, такие как, например, *Enterobacterium sp*, *Bacteroides*, *Acetobacter* и *Eubacterium*. [11]

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.

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). [15]

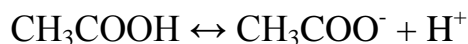
Путем различных ферментационных реакций продукты гидролиза преобразуются, главным образом, в различные органические кислоты (уксусную, пропионовую, масляную, янтарную, молочную и т.д.), спирты, аммиак (из аминокислот), диоксид углерода и водород.

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). [68]

Кислотная постоянная (pK_a) показывает, как легко кислоты выпускают свой протон. Если pH ниже значения pK_a , то большинство кислот находится в незаряженной форме, в то время как при pH выше значения pK_a 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.

Форма кислоты и анион имеют разные названия (например, уксусная кислота и ацетат) (таблица 1.2.).



Уравнение 1. Уксусная кислота в равновесии со своей анионной формой, ацетатом. [49]

Таблица 1.2.

Названия некоторых распространенных кислот и значения pK_a для них.

Значения относятся к водным растворам при $25^\circ C$

Общее название	Систематическое название	Анион	pK_a	Химическая структура (кислотная форма)
Муравьиная кислота	Метаноик кислоты	Соль муравьиной кислоты (формат)	3,77	$HCOOH$
Уксусная кислота	Этаноловая кислоты	Ацетат	4,76	CH_3COOH
Пропионовая кислота	Пропановая кислоты	Пропионат	4,80	$CH_3 CH_2 COOH$
Масляная кислоты	Бутановая кислоты	Бутират	4,83	$CH_3 CH_2 CH_2 COOH$
Валериановая кислота	Пентановая кислоты	Валериат	4,84	$CH_3 CH_2 CH_2 CH_2 COOH$
Каприловая кислоты	Капроновая кислоты	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.). 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). [10,16]

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. [8]

Таблица 1.3.

Продукты ферментации глюкозы, образованные двумя различными видами бактерий соответствующего рода Клостридиума. Цифры представляют собой количество образованных моль на 100 моль глюкозы

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

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. [45]

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.

Во время анаэробного окисления, протоны используются в качестве окончательных акцепторов электронов, и это приводит к выделению газообразного водорода. [25,42]

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

Если образованный газообразный водород, не будет непрерывно удаляться, процесс анаэробного окисления остановится, потому что микроорганизмы больше не получают достаточно энергии для роста (рис. 1.1.).

На рисунке изображена зона, в которой происходит метанообразование. В ходе этого процесса постоянно поглощает водород, при этом сохраняется его концентрация на достаточно низком уровне. [54]

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.



Рис. 1.1. 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).

Согласно литературным данным, такое сотрудничество между микроорганизмами называют синтрофным, а передача газообразного водорода - "межвидовым переносом водорода" (ИТ), 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.

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. [51]

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 водородопоглащающих 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. [48]

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.

Четвертая 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. [46,72]

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.

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 1.4.

Время удваивания и самая низкая допустимая концентрация ацетата
для Метаносарцизы и Метаносаеты

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. [33]

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.

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). [39]

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.

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.

1.3. Использование различных растительных питательных субстратов при получении биогаза

Каждый субстрат, корм, продукты питания, биоотходы или органические отходы, состоят из групп веществ. При оценке субстрата следует учесть, что только из сухой массы, и в этом случае, только из ее органической части можно произвести метан. Поэтому содержание органической сухой массы в соотношении с общей массой является первым критерием для выбора составляющих смеси субстратов. Поэтому не удивительно, что количество добытого газа из 1 тонны (единица измерения) зерна в несколько раз выше чем при использовании силоса из целого растения либо барды, которые содержат значительно большее количество воды, из которой нельзя образовать газа. (табл. 1.5.). [35]

Таблица 1.5.

Содержание воды в разных видах субстратов

Субстрат	Содержание в %
Барда	90-94
Сухой фураж, зерновые	12-15
Зеленый корм, корни, клубни	75-85
Промышленный корм	10-15
Силос	80
Сухая зеленая масса	5-12
Сенаж	60-70

Неорганический компонент, называемой в аналитических материалах также сырым пеплом, состоит из песка, земли, камней, металлической стружки от перерабатывающих машин и похожих веществ, попадающих в собранный урожай и навоз, либо в органические отходы. Такие составляющие нежелательны для процесса выработки биогаза, поскольку из них нельзя добыть биогаз и, кроме того, они приводят к техническим проблемам как-то их оседание. Свекла, например, содержит большое количество такой фракции. Органическое вещество состоит из протеина, жиров, а также легко и тяжело разлагаемых углеводов.

Жиры являются разновидностью трехзначного алкоголя глицерина, к которому прикрепляются от одной до трех одинаковых либо разных жирных кислот (карбоновых кислот). Их называют соответственно моно-, ди- или триглицеридами. Жиры являются постоянными смесями разных триглицеридов и разлагаются на жирные кислоты и глицерин. Слишком большое количество жира приводит к накоплению органических кислот, поэтому снижается уровень pH и замедляется образование уксусной кислоты и метана. [13]

Протеины (белок) являются сложномолекулярными, состоящими из аминокислот, соединениями. Они, также как и углеводы и жиры, состоят из углерода С, водорода Н, кислорода О, но кроме этого содержат азот, серу, фосфор. Протеины разлагаются на пептиды, потом – аминокислоты, и в конце на органические кислоты. Для разложения белка и жира состав рациона не имеет значения по сравнению с разложением углеводов.

В группе углеводов различают легко поддающиеся разложению и смешанные углеводы с очень разветвленной и сложной структурой, которые очень тяжело переваривать:

- Моносахариды: сахар, глюкоза, фруктоза
- Олигосахариды (до 10 моносахаридов): сахароза (сахар сырец), лактоза (молочный сахар), мальтоза (солодовый сахар)

- Полисахариды (с большой молекулярной массой): крахмал, гликоген, целлюлоза, инулин
- Гетерополисахариды (смешанные углеводы со сложной структурой): гемицеллюлоза, пектины, лигнин – собственно не является углеводом, но зачисляется аналитиками в группу углеводов. Он являет собой одеревяненное вещество растений и стойкий к разлагающему воздействию бактерий и кислотам. Принято считать, что лигнин не переваривается.

Углеводы расщепляются бактериями на простой сахар и разлагаются до низких жирных кислот (уксусная, масляная, пропионовая). Количество образовавшихся кислот и процент содержания каждой отдельной кислоты зависит от состава углевода. Из процесса переваривания у жвачных парнокопытных (их желудок представляет собой не что иное как биогазовую установку с очень коротким периодом брожения, мы знаем, что богатые на крахмал и сахар субстраты ведут к возрастанию содержания пропионовой и масляной кислоты, в то время как целлюлоза, также богатый на волокна субстрат, меняет состав жирных кислот в сторону доминирования уксусной кислоты. Кроме того состав углеводов определяет уровень рН и количество живых микроорганизмов. Если пища содержит много крахмала и сахара, уровень рН уменьшается, уступая кислотной среде, количество бактерий быстро увеличивается. Это приводит к еще более быстрому разложению углеводов и возможному переокислению ферментатора. [59]

Уровень рН снижается. Увеличивается количество бактерий, образующих пропионовую кислоту, а образующих уксусную наоборот уменьшается. Таким образом замедляется образование уксусной кислоты как исходного материала для метана. Жвачные животные в таких случаях оказываются от дальнейшего приема пищи (рубцовый ацедоз), но биогазовая установка не страдает. При использовании субстратов с очень большим содержанием сахара или углеводов, каковыми например являются зерна пшеницы, кукурузы

или сахарная свекла, то стоит особенно тщательно следить за подачей этих материалов. Это наверняка одна из причин, почему на практике не получило большого распространения чистое использование зерновых или сахарной свеклы. Обслуживание такого процесса на обычных одноступенчатых установках является просто слишком дорогостоящим. [64,18]

Влияние субстрата на количество биогаза и образование биогаза. Точно в соответствии с процентом веществ каждой группы: протеинов, жиров и углеводов определяется выход газа и процент метана в биогазе (табл. 1.6.)

Таблица 1.6.

Влияние соединений углеводов на бактерии, уровень рН, скорость разложения и соединения из жирных кислот. Относительное содержание в рационе

	Содержащие целлюлозу	Содержащие крахмал	Содержащие сахар
Содержание микроорганизмов	Относительно низкое	Относительно высокое	Относительно низкое
Уровень рН	Высокий (6,5)	Низкий (5,7)	Очень низкий (5,1)
Разложение	Медленно	Быстрое	Очень быстрое
Образцы жирных кислот			
Уксусная кислота	Высокое	Низкое	Низкое
Пропионовая кислота	Низкое	Средневысокое	Высокое
Масляная кислота	Низкое	Средневысокое	Высокое

Максимальное количество метана в биогазе получаем из протеинов – 71%; жиры также дают газ высокого качества с содержанием метана 68%. Хуже всего результаты у углеводов – лишь 50% метана в газе. Хотя углеводы в целом вырабатывают на 90 литров больше биогаза чем протеины, из-за малого содержания метана, выход ограничивается лишь 400 литрами метана на кг органического сухого вещества. Сырой жир вырабатывает до 850 литров метана с килограмма сухого органического вещества – самый высокий выход метана, в то время как сырой протеин дает 490 литров метана из килограмма органического сухого вещества. Если исходить исключительно из выхода газа, предпочтение стоит отдавать смесям субстратов с высоким содержанием жиров и протеинов (диаграмма 1.1.). [34]



Таким образом четко видно, что нет единого показателя выхода газа. В случае изменения состава смеси субстрата, колеблется также и выход газа и его качество. Эта взаимосвязимость отображена в больших колебаниях в данных по выходу газа для одного и того же субстрата (рис. 1.2.).



Рис. 1.2. Выход газа с разных субстратов и их дисперсия

О пригодности субстрата для брожения нельзя судить лишь по одному выходу биогаза. Наоборот, необходимо принимать во внимание целый ряд дополнительных факторов. Если, например, использовать биоотходы, то строительство и эксплуатация установки должны согласовываться с правилами работы с отходами. Это значит, что необходимо соблюдать особые условия, напр. например, разделение на чистые и нечистые половины (поставка и вывоз). Такие особые правила имеют влияние не только на составление документации, но и на затраты и рентабельность установки, и должны быть поэтому своевременно хорошо продуманы. Похожие правила действуют для субстратов как то сепарированный жир или отходы продуктов питания. Они хоть и дают большой выход метана, но вызывают частично очень высокие требования, связанные с разрешениями от государства и техническими потерями, поскольку все они попадают по классификации под требования к побочным продуктам (ЕС Nr. 1774/2002). Субстраты с высоким содержанием воды, к каковым относятся барда достаточно неэффективно занимают ферментаторы, требуют места для хранения и приносят по сравнению с количеством вносимого материала небольшое количество газа. Субстраты с большой плотностью энергосодержащих веществ, то есть с большим содержанием сухого вещества (напр. (остатки зерна) являются наиболее эффективными как с точки зрения хранения, так и занимаемого места в ферментаторе, но быстро вызывают биологические нарушения в процессе и поэтому не могут быть использованы в больших количествах. Быстроразлагаемые субстраты – сахарная свекла, отходы продуктов питания и др., приводят к стремительному переокислению ферментатора, поэтому мало подходят для брожения в чистом виде. Поэтому стоит их использовать в смеси с другими субстратами. Необходимо также учесть их способность к хранению, консервированию и затраты на хранение и подачу таких субстратов. Например свеклу длительное время можно хранить в подкисленном состоянии, если хотите сохранить ее высокое качество. Такие требования в свою очередь тоже требуют больших капиталовложений в технические средства. Хранение силосной кукурузы на-

оборот с технической точки зрения очень простое, но требует больших площадей. Также следует следить за чистотой субстратов. Кормовая и сахарная свекла заносит в ферментатор прикрепившиеся к ним землю и камни, так что для них необходимо предусматривать очистку от выпадающих осадков. В субстратах, происходящих от агропромышленности и сопутствующих перерабатывающих предприятий, могут содержаться вредные вещества. При использовании таких материалов необходимо проводить соответствующие (регулярные) исследования с целью обеспечения надежности процесса. Для возобновляемого сырья, кроме выхода газа, важную роль играет также экономически оправданное его выращивание; это включает в себя факторы как производительность посевных площадей под культуры, урожайность и содержание питательных веществ, уровень производительности, затраты на подготовку (урожай и его транспортировка), а также цена аренды посевных площадей. Длительная доступность субстратов требует планирования. Если будут использоваться косубстраты, то гарантией их поставок должны являться как можно более длительные контракты на поставки. Установки, слишком зависящие от арендованных земель, более подвержены риску, нежели установки, работающие преимущественно на сырье со своих полей. По этой причине необходимо заключать как можно более долгосрочные контракты аренды. Не в последнюю очередь бонусная система Закона ЕС о возобновляемых источниках энергии, влияет на выбор субстратов. Все субстраты, которые специально не производятся для биогазовых установок, теряют бонус для возобновляемых источников энергии в размере 6 центов/кВт/час. Если провести оценку допущенных к использованию в сельскохозяйственных биогазовых установках субстратов, то выгодные с экономической, правовой и биологической точки зрения, то наиболее подходящими окажутся группы промышленно производимых удобрений и возобновляемых энергоресурсов. [55]

Резюмируя, при выборе субстрата необходимо учитывать такие аспекты:

- Влияние на получение разрешения и законодательные требования к строительству и эксплуатации
- Влияние на технику и эксплуатационные затраты
- Хранение и консервирование
- Производительность площадей, затраты на производство и хранение
- Загрузка пространства бродильной камеры и эффективность
- Биологические факторы, влияющие на процесс
- Плата за произведенную электроэнергию
- Доступность субстрата

Принципиально все органические вещества можно хотя бы частично разложить как аэробным, так и анаэробным путем. Принципиальным правилом является: твердые, со сложной структурой материалы как древесина и солома лучше подходят для аэробных условий, то есть компостирования, в то время как текучие, жидкие материалы - навоз, отходы продуктов питания, жиры и т.д. лучше разлагаются в анаэробных условиях, то есть при брожении.

На табл. 1.7. приведены типичные вещества-отходы, которые подходят как для аэробного, так и для анаэробного разложения. [61]

Таблица 1.7.

Расчет для единиц крупного рогатого скота

Вид животных	КРС/штук
Крупный рогатый скот	
Телята и молодой скот до 1 года (вкл. откормочных телят, молодняк)	0,30
Молодняк от 1 до 2 лет	0,70
Телки (старше 2 лет), мясные быки, коровы (вкл. Телок с молочными телятами)	1,00
Племенные быки, рабочие волю	1,20
Свиньи	

Поросята до 12 кг	0,01
Поросята более 12 кг до 20 кг	0,02
Поросята и подвинки более 20 кг до 45 кг	0,06
Поросята более 45 кг до 60 кг, откормочные свиньи, откормочный молодняк до 90 кг	0,16
Овцы	
Овцы до 1 года	0,05
Овцы более 1 года	0,10
Лошади	
Лошади младше 3 лет и маленькие лошади	0,70
Лошади от 3 лет	1,10
Птица	
Вид животных	Животных/единицу КРС
Куры-бройлеры и молодняк кур (1 возрастная группа, макс. вес 800 г)	420
Куры-бройлеры и молодняк кур (2 и более возрастные группы, макс. вес 800 г)	625
Несущиеся куры (максимальный вес 1600 г)	310
Несущиеся куры (максимальный вес 1500 г)	330
Примечание: единица крупного рогатого скота соответствует 500 кг живого веса	

При этом содержание сухого вещества в первую очередь является решающим, каким методом (брожение или компостирование) их лучше всего перерабатывать. В целом можно сказать, что для мокрого метода, лучше чтобы содержание сухого вещества было 5-15%. Если содержание сухого субстрата меньше чем 5%, то процессы будут также происходить, но будет необходимость «бесполезного» добавления слишком большого количества воды, что существенно будет влиять на рентабельность. 15% содержания сухого субстрата является верхней границей, при которой субстрат еще можно перекачивать насосом, перемешивать либо смешивать. Сухой метод рассчитан на сыпучие материалы с содержанием сухого вещества свыше 25%. Содержание сухого вещества в пригодного наилучшим образом к компостированию материала составляет от 40 до 60%. [29,38]

Важным, как и раньше является соотношение углерода и азота (соотношение C:N), которое должно составлять от 10 : 1 до 40 : 1. Отходы сельскохозяйственного содержания животных создают хорошие условия, как для анаэробного, так и для аэробного брожения, поскольку они имеют сбаланси-

рованный состав питательных веществ и большой буферный потенциал. При составлении рациона, важно чтобы загрузка ферментатора была как минимум меньше 4 кг, еще лучше если меньше 3 кг орган.СВ/м³, независимо от вида субстрата или его смеси. При сельскохозяйственном производстве биогаза за последние годы произошли большие изменения в видах используемых субстратов. Сейчас на практике редко бывает, чтобы использовали исключительно жидкий или твердый навоз. Лишь некоторые большие предприятия в восточной Германии обслуживают биогазовые установки, работающие исключительно на жидком гное. [5,37]

Большинство установок для своей работы используют силос из целых растений, остатки зерна и силос из сена, иногда работают вообще без гноя. Кроме большого выхода газа и большой степени разложения, энергетические растения благодаря поддержке со стороны Законодательства о возобновляемых источниках энергии ЕС приобрели особое значение. [3]

Все, что в прошлом вызывало столько затрат и вопросов с точки зрения получения разрешений, законодательства, техники и эксплуатации для коферментации, сегодня не создает никаких проблем. Значение коферментами органических отходов от коммунальных хозяйств и агропромышленности существенно снижается. Высокие требования к безопасности, технике, документации и получении разрешений, а также не в последнюю очередь конкурентная борьба за косубстраты, привела к снижению интереса к субстратам и разработанным под них установкам. Строящиеся или еще существующие на сегодняшний день коферментационные установки имеют высокую специализацию, хорошо оснащены технически и соответствуют самым современным требованиям.

Смесь, состоящая из множества разных субстратов, в зависимости от вида субстратов, имеет очень разные характеристики по расслоению. Это в свою очередь влияет на оседание и образование плавающей корки и должно учитываться при выборе мешалки (техники и ее мощности) (смотри также

Раздел «Удаление тяжелых веществ»). Всегда действует правило, что чем гуще субстрат или смесь, тем менее она склонна к расслоению. Гомогенная смесь с небольшим размером составляющих частиц и высоким содержанием СВ, каковой например является навоз крупного рогатого скота перемешанный с растительными косубстратами, имеет небольшую склонность к расслоению. Повышенную склонность к расслоению имеет текучий жидкий навоз свиней и жидкий куриный помет, картофельный сок и сточная вода в сочетании с растительными косубстратами как, например неизмельченная свежая солома, скошенная трава и т.п. [74]

С использованием растительных культур в биогазовых установках, сельскохозяйственное производство получило совершенно новое направление: если раньше сельское хозяйство в Германии и Европе занималось производством продуктов питания и корма, то сейчас все большее количество площадей отдаются под энергетические растения, используемые в биогазовых установках. Часто выращивание энергетических растений считают отдельной отраслью производства и для некоторых фермеров она является главным источником дохода. В качестве энергетических растений, пригодных для использования в биогазовых установках, в принципе, могут выступать лишь несколько видов выращиваемых на полях культур. В реальности в основном речь идет о тех культурах, которые после переработки в биогазовых установках приобретают более высокую рыночную стоимость. В качестве энергетических растений используют преимущественно перечисленные на рис. 1.3. [30]

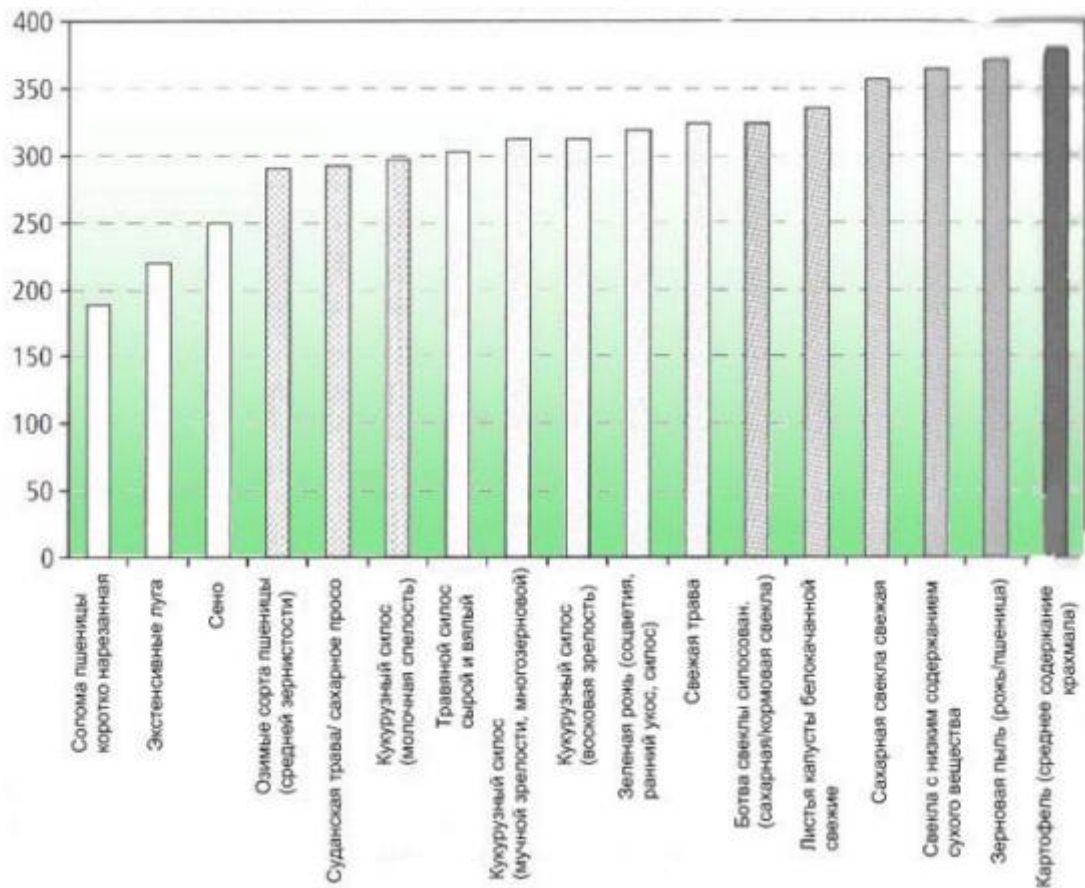


Рис. 1.3. Растения, наиболее подходящие для брожения и выхода газа из них

Установки, использующие лишь возобновляемое сырье и навоз для выработки электроэнергии, получают за выработанную электроэнергию финансовое поощрение. Чтобы отбросить все сомнения, что подразумевается под понятием возобновляемого сырья как это изложено в Законе о возобновляемых источниках энергии, на домашней электронной странице «Отраслевого объединения биогазовой техники», так называемый одобренный список тех культур, за которые предусматривается бонус.

С точки зрения выхода газа лучший результат дают субстраты с высокой концентрацией энергии: отходы зерна, свекла и картофель. Выход метана, достигаемый с их помощью может достигать до 350 - 380 л/кг органического сухого субстрата. Кроме этого есть большая группа, состоящая из свежей травы, ботвы свеклы, силоса травы, кукурузы и зерновых растений, выход метана из которых составляет от 270 до 330 л/кг органического сухого

субстрата. Самый малый выход газа ниже 200 л/кг органического сухого субстрата имеет солома. Таким образом ее можно сравнить с навозом скота. В целом, энергетические растения имеют скорее малые колебания, так что обобщая, теоретический выход газа из энергетических растений будет составлять 300 л метана на кг органического сухого субстрата с колебанием $\pm 30\%$. [40]

Существенно большую разницу проявляют энергетические растения при расчете выхода с гектара. Если выход с гектара умножить на специфический выход метана, то получится производительность метана с единицы площади для конкретного вида культуры. Самый высокий выход метана из сухой массы мы имеем со свеклы и урожайных силосных сортов кукурузы, который может составлять свыше 6000 м³ СН₄/га. *Miscanthus* как многолетняя культура хоть и дает хороший урожай биомассы от 200 центнеров/га, но низкий выход метана снижает производительность площадей до уровня трав и силоса со всего растения, имеющих в среднем выход от 4000 м³ метана/га. Зерно и клубни хоть и имеют высокий особый выход газа, но если перенести его на производительность площадей, то он будет составлять 3000 м³ /га, что все таки ниже чем силос с целого растения. Им просто не хватает количества биомассы всего растения. Промежуточные культуры имеют самую маленькую производительность с площадей, ниже 2000 м³ СН₄/га, это связано с коротким вегетационным периодом. [2,65]

Силос из зерновых растений. Силос из зерновых культур пользуется все большей популярностью, поскольку они очень хорошо подходят к севообороту энергетических растений, могут выращиваться на глинистых грунтах, давать при низких весенних температурах хороший и стабильный урожай. Часто используют рожь как неприхотливое озимое растение. Но подходят все виды зерновых культур. Выбор должен осуществляться в зависимости от конкретной местности. Оптимальное время для сбора урожая это когда зерно уже пригодно для теста, то есть когда зерно налито и при сжимании

колоса не выделяется сок, а зерно можно выдавить из шелухи. Содержание сухого вещества составляет тогда 35-40%. Это то время, когда возможно максимальное переваривание всего растения и доступна максимальная плотность энергии. Зерно не так хорошо силосовать как кукурузу, поэтому длина сечки должна как можно точнее соответствовать 4 мм, чтобы можно было расщеплять и достигнуть быстрого окисления в силосном бункере и таким образом хорошей плотности. Выход находится в пределах от 80 до 140 центнера/га. Силос с целых зерновых растений содержит так же, как и травы большое количество сырого протеина и азота (N). Их высокий процент в смеси субстратов или слишком большая нагрузка бродильной камеры могут привести к задержкам вызванным аммиаком (табл. 1.8.). [1,27]

Таблица 1.8.

Содержание протеина и азота в разных видах энергетических растений

Содержание протеина и азота в разных видах энергетических растений		
Растения	Сырой протеин (гр/кг)	Азота (гр/кг)
Ячмень	104	16,64
Овес	110	17,6
Рожь	98	15,7
Пшеница	119	19
Кукуруза	95	15,2
Картофель	20	3,2
Отходы из початков кукурузы с листьями	76	12,2
Свежий зеленый корм	33	5,3
Кукурузный силос	24	3,8
Силос злаковый	60	9,6
Силос злаковый, содержащий клевер и травы	65	10,4
Смесь из клевера и трав	70	11,2
Зерно GPS (рожь)	19	3,0

Силосная кукуруза на сегодняшний день является самым важным видом культур для использования в биогазовых установках. Кукурузу называют еще растением C4 из-за большого выхода сухой массы. Необходимая для переработки этой культуры техника как правило всегда есть в наличии на предприятиях либо хорошо известна и недорога. Кукуруза легко силосуется

и даже при чистом использовании не вызывает нарушений в процессе работы биогазовых установок. Сегодня уже есть специальные сорта для использования в биогазовых установках. Эти сорта как правило дают больший выход биомассы. Более поздние сорта позволяют также получать более поздние урожаи. Оптимальным временем для сбора урожая является его готовность для силосования, переваривания и погодные условия. [21]

Как правило кукуруза во время сбор должна иметь содержание сухого вещества 28-35% и пребывать в состоянии между молочной спелостью и пригодностью для муки. В благоприятных районах для выращивания от поздних сортов можно получить большой выход с посевных площадей в размере более чем 8000 м⁵ метана/га. Выход от посевов силосной кукурузы колеблется между 120 и 270 центнерами/га, выход газа между 300 и 380 литрами на кг органического сухого вещества.

По причине возрастания размеров биогазовых установок, растет также потребность в площадях для силоса, а таким образом и затраты на покрытие. Новым решением для покрытия является посев ржи вместо силосной пленки.

Этот природный вариант силосного покрытия имеет несколько преимуществ:

- потери рабочего времени и денег меньше чем при покрытии пленкой.
- покрытие разлагается под биологическим воздействием.
- можно просто покрывать поверхность новым слоем силоса, таким образом отпадает затратное накрывание-раскрывание.
- в зависимости от рациона, площадь нарезания силоса может быть небольшой, поскольку будет использоваться только этот вид силоса.

Исследования, проведенные над силосом с ржаным покрытием центром ЕВА в Трисдорфе в 2005 г. показали, что выход метана не меняется, но в верхней части шара силоса происходит существенное сокращение органической сухой субстанции (до 15% сухого вещества на 30 см глубине или 12% сухого вещества в покрывном шаре). Если принять во внимание, что кукурузный силос силосуеться с одержанием сухого вещества 28-35%, то значит в этом шаре почти половина сухого вещества теряется вследствие аэробного разложения. Такие потери соответствуют приблизительно эффекту от средне покрытого пленочного силоса. В этом случае уменьшение энергии нетто будет составлять до 20%. Соответственно при накрытии путем посева поверхность силоса должна быть небольшого размера. Кроме того при использовании такого вида покрытия в большинстве случаев замечались грызуны вредители (крысы, мыши). [67]

Отходы початков растений (Corn-Cob-Mix (CCM)) и чистые кукурузные зерна значительно отстают в отношении выхода с единицы площади по сравнению с урожаем силосной кукурузы, но имеют значительно высшую плотность энергии, а таким образом и выход газа. Они также более выгодно занимают рабочий объем ферментатора по сравнению с силосом кукурузы. Чтобы обеспечить постепенную подачу, их тоже приходится хранить и консервировать. С точки зрения биологических процессов они быстрее вызывают окисление и перенагруженность. [19,22]

Выход с лугов зависит от места расположения и интенсивности использования, различия бывают очень большие и колеблются от 40 до 120 ценнеров сухой массы с га. Луга по уровню выхода отстают от энергетических растений, чтобы сопоставить выход с ними необходимо по меньшей мере собирать урожай трижды в год.

На выход метана также влияет место расположения и интенсивность использования. Анализы, проведенные Кайзер в 2004 г. показывают, что интенсивное использование лугов (5 укосов) дает выход метана свыше 300 лит-

ров/кг органического сухого вещества по сравнению с экстенсивным использованием участков, при котором эксплуатация дает до 300 литров. Набор произрастающих на лугу видов растений также имеет влияние на выход метана. Для плевела, мятлика лугового и овсяницы выход колеблется между первым и вторым укосом в пределах 250 и 350 литров/кг органического сухого вещества; они в целом достигают такого же уровня, как и *Leguminose* – 300 литров/кг органического сухого вещества. Лишь люцерна с выходом 200-250 л/кг органического сухого вещества значительно отставала по показателям. Таким образом, можно предположить, что и в целом также на лугах можно создать оптимальные с точки зрения энергии смеси посевных растений. [24]

Травяной силос хорошо годится для брожения. Единственное, что высокий потенциал сырого протеина при высоком содержании клевера может вызвать задержку развития бактерий. Также клеверо-злаковая травосмесь при помешивании имеет тенденцию к сплетению. Здесь необходимо уделить внимание тщательному измельчению и подбору соответствующей перемешивающей техники (медленно перемешивающей). [41]

Суданская трава как и кукуруза относится к растениям С4, а следовательно очень эффективна с точки зрения использования воды и питательных веществ. В Америке используется как полевой корм, для сена, силоса и в свежем виде. У нас все чаще используют как пожнивную культуру после зерновых для брожения. Суданская трава поставляет большое количество сухой массы, относительно нетребовательна к наличию в грунте воды и питательных веществ, хорошо силосуется. Растение не способно переносить даже небольшие заморозки и за зиму вымерзает. Сеется в зависимости от места расположения под конец апреля вплоть до середины мая (20-22 кг/га). Требования к подготовке грунта небольшие, достаточно культиватора и дисковой сеялки. Суданскую траву можно косить по несколько раз, она снова отрастет. Посев после сбора зерновых в июне/июле может не принести желаемого

большого урожая через летнюю сухость и возможные ранние заморозки. При двух укосах можно собрать 120 и 200 центнеров/га сухой массы. [40]

Сбор урожая суданской травы происходит наипознее при появлении ложных колосьев, когда содержание сухого вещества менее 20%, поскольку иначе трава начнет быстро деревянеть. Составляет сильную конкуренцию другим растениям. Но несмотря на это требует использования гербицидов, для чего, вследствие отсутствия разрешения на применения таких средств необходимо подавать заявку о исключительном применении в соответствующее Земельное ведомство по вопросам сельского хозяйства, согласно § 18 Закона о защите растений. Китайский камыш (слоновья трава).

Китайский камыш является многолетним растением, происходящим из Восточной Азии, из группы C4, достигающее высоты до 4 м и дающее выход сухой массы до 250 центнеров на гектар. *Miscanthus* в отличие от многих других энергетических растений многолетняя культура, высаживаемая на 15-20 лет. Высаживается штеклингами (черенками), что делает ее несколько дороговатой. В первый год зимовки имеет склонность к вымерзанию, поэтому высокий урожай достигается лишь к 4 году. После жатвы *Miscanthus*, оставшиеся корневища снова дают побеги чем могут мешать выращиванию других культур вместо них. [47]

Среди культур энергетических растений именно поэтому и из-за низкого выхода газа *Miscanthus* не используют.

Выход энергии с гектара зерна злаков или их отходов ниже, чем из силоса целых злаков. Если сделать пересчет выхода энергии с единицы посадочной площади, то преимущество будет на стороне силоса из целых растений. Чистое брожение злаковых имело бы с энергетической точки зрения смысл, если бы биологическим процессом в сельскохозяйственных установках можно было управлять. Зерно очень быстро разлагается и приводит к быстрому переокислению. Из-за высокого потенциала содержания протеина в

зерне повышается также риск задержки в развитии бактерий через действие аммака, так что при брожении чистой культуры, стоит использовать двухступенчатую систему для лучшего управления процессом.

При определенной доле отходов в смеси субстрата, как показывает практика, это имеет позитивный эффект на производство газа: определенное содержание легко разлагаемой субстанции повышает активность бактерий, что приводит к повышению скорости разложения и степени разложения в ферментаторе. [73]

Если субстрат имеет склонность к образованию плавающей корки, необходимо обязательно включить отходы в состав смеси субстратов. Чтобы создать оптимальный с точки зрения энергии севооборот для биогазовых установок, необходимо согласовать между собой три влияющих фактора:

1. Выбор сортов и последовательность их выращивания с высоким выходом от каждого сорта (органической сухой массы с гектара в год).
2. Выбор сортов с учетом высокого специфического для каждого сорта выхода метана и наилучшей сочетаемости питательных веществ при их смешивании
3. Оптимизация составляющих веществ исходя из максимального потенциала образования метана среди разных культур (например повышение содержания жиров через интеграцию масляных культур).

Кроме того при выборе отдельных культур для оптимальной последовательности севооборота нельзя забывать и об экологических аспектах. Исключительное возделывание кукурузы было бы правильным с точки зрения выхода с посевных площадей, однако приводит к большому размножению грызунов-вредителей и болезням, к нетто-разложению гумуса. Соблюдение правил хорошей профессиональной практики должно само собой действовать также при выращивании энергетических растений. Для оптимального с точки зрения энергии севооборота, лучше всего использовать комбинацию групп

растений С3 и С4. Холод зимой лучше всего переживают растения группы С3, в то время как богатые на биомассу теплолюбивые растения группы С4 хорошо переживают лето. Это делает возможным получение двукратного урожая на протяжении года с общей производительностью около 250-300 центнеров сухой массы с гектара. [62]

К группе растений С4 принадлежат кроме кукурузы также просо, сахарный тростник и амарант. Большим недостатком этих растений является их чувствительность к холоду. Это ставит некие ограничения их потенциалу производительности при выращивании в наших широтах. В прохладные и холодные месяцы между серединой октября и концом апреля с большим преимуществом они уступают отечественным растениям группы С3 (табл. 1.9.).

Таблица 1.9.

Характеристики растений групп С3 и С4

Зерновые, картофель, травы, плевел, конопля, рапс, сурепка масличная, подсолнечник, горох С3	Кукуруза, просо, сахарный тростник, суданская трава, амарант С4
Преимущество использования в холодные и зимние периоды	Существенно более высокий потенциал выхода в летние месяцы
Оптимальная ассимиляция при 23 °С	Оптимальная ассимиляция при 30 °С
Выход сухой массы: 80-120 цт/га	Выход сухой массы: 190-250 цт/га
Нормы потребления воды: 500-700 л Н ₂ О/кг сухой массы	Нормы потребления воды: 250-400 л Н ₂ О/кг сухой массы
Эффективность питательных веществ: 1 мг N/39 мг сухой массы	Эффективность питательных веществ: 1 мг N/57 мг сухой массы

В такой системе использования двух культур нет предела для комбинационных возможностей. Доктор Карпенштайн-Махан и проф. д-р Шеффер (Кассель-Витценхаузен) разработали многие такие системы использования двух культур и прежде всего провели испытания для их использования в биологически обоснованном сельском хозяйстве. [57]

Первичные культуры (озимые сорта зерновых, озимые бобовые, озимые сорта рапса) собирают как правило на стадии молочной зрелости, таким

образом до середины июня вплоть до начала июля можно выращивать второй урожай (кукуруза, подсолнух, фазелия, летняя сорта злаков и т. д.). Через ранний сбор первого урожая не могут размножиться многие сорняки, что помогает отозаться от использования гербицидов. Уже имеющиеся сорняки помогают даже приумножить выход сухого вещества. Такая комбинированность урожаев помогает получить выход сухого вещества от приблизительно 250 центнеров/га и даже при плохих условиях при достаточном количестве осадков имеет преимущество перед кукурузой. В качестве лучших культур для первого урожая выступают озимые зерновые. Ячмень, рожь и тритикале имеют свои преимущества перед пшеницей из-за ранней зрелости. [43]

В этом направлении сельскохозяйственные исследования находятся еще в своей начальной стадии. Стоит рассчитывать на то, что благодаря селекционной работе удастся достичь существенного повышения потенциала образования биомассы.

Моноброжение и энергетические растения. Возможно ли использование для брожения одного единственного сорта растений (например только кукурузы или только трав) без дополнения гноем в долгосрочной перспективе, тема спорная среди экспертов. Прежде всего те, кто сами на практике занимаются брожением одних и тех же видов - кукурузы или травяного силоса, считают моноброжение ограниченным. Они считают, что односторонний состав питательных веществ приводит к недокармливанию бактерий. Кроме того быстрая разлагаемость энергетических растений приводит к образованию неблагоприятных условий среды обитания для метанообразующих бактерий, что может вызвать даже коллапс процесса. Моноброжение, по мнению экспертов, возможно лишь при малой загрузке бродильной камеры или при применении двухступенчатой системы, а для долгосрочного использования всегда требуется добавление микродоз питательных веществ или гноя [44].

Большинство действующих установок работают на смеси субстратов, состоящей из множества компонентов, и те из них, которые действительно

практикуют моноброжение, практикуют его как правило не дольше 2 лет и как минимум при запуске использовали «порцию гноя». До тех пор, пока можно отказаться от использования гноя и бактерии привыкнут к моносубстрату, время брожения в пять раз дольше обычного. Почти все эксперименты, известные нам до последнего времени, не давали лучших результатов.

Брожение барды от сельскохозяйственных винокурен. Хотя барда является чистого вида отходом, но при брожении барды от сельскохозяйственных винокурен вместе с другими возобновляемыми видами сырья она попадает под дотации для энергии из возобновляемых источников, что является оптимальное сочетание между сельскохозяйственным производством алкоголя и производством биогаза. [63]

Барда является отходом при производстве алкоголя. В зависимости от исходного материала, из которого производят алкоголь, разделяют зерновую, картофельную или фруктовую барду. Барда отличается очень низким содержанием сухого вещества, ниже 5%. Из м³ такого субстрата, поэтому получается более низкий выход газа, при одновременной потребности наличия большого ферментатора. На килограмм органического сухого субстрата выход метана будет от 250 до 350 литров, что соотносимо с выходом от возобновляемых источников энергии.

Поскольку она легко разлагается, то в анаэробных условиях очень быстро образовывается переокисленная среда. Поэтому при чистом использовании барды необходимо прибегнуть только к двухступенчатой технологии, чтобы не перегружать метановые бактерии. При коферментации с другими сельскохозяйственными субстратами (преимущественно одноступенчатым методом) их нужно тщательно отбирать, но из-за высокого содержания воды хорошо подходит материал с большим содержанием сухого субстрата.

Если проанализировать, что из 900 спиртовых производств закрытого типа в Германии, 880 производят менее чем 700 м³ в год, то есть являются

очень маленькими спиртзаводами и 70% ферментационного алкоголя производится на сельскохозяйственных спиртзаводах, можно сделать вывод, что здесь еще зарыт огромный неиспользованный потенциал для сельскохозяйственного производства биогаза. Предприятие в Гут Хюлле, недалеко от Гаутинга возле Мюнхена уже реализовало именно эту выгодную комбинацию от производства алкоголя для горючего и производства биогаза. С уверенностью можно сказать, что скоро появится и много других их последователей. [44,56]

ГЛАВА 2. ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКАЯ ЧАСТЬ

2.1. Материалы исследования

В своей работе мы использовали тест-систему ENTEROtest 24: Инструкция к постановке ЭНТЕРОтест 24 Н.

Материалы, необходимые для работы (не входят в набор):

- Парафиновое масло стерильное (кат. № 10003371 - 150 определений)
- Чашки Петри со средой для выделения микроорганизмов
- Пробирка (кат. № 50001530) с 3 мл стерильного незабуференного физиологического раствора
- Прибор для гомогенизации приготовленной суспензии, например, Vortex V1 (кат. № 50001715)
- Дозатор на 0,1 мл, стерильные наконечники, например, Микро-Ла-Степпер (кат. № 50001707)
- Термостат на 37°C
- Стандартное оснащение микробиологической лаборатории (петли, маркеры, горелки)

Материалы, необходимые для постановки дополнительных тестов (не входит в набор): ИНДОЛтест (кат. № 10010255 – 140 определений) или КОЛИтест (кат. № 10003326, содержит тест на ИНДОЛ и для его визуализации требуется Реактив для теста ИНДОЛ (кат. № 10003372).

Результаты Индол теста необходимы для определения вида в рамках рода (особенно для родов *Klebsiella* и *Citrobacter*)

Дополнительно поставляемые материалы (не входят в набор): ОКСИтест (кат. № 10003324 – 50 определений); ОФтест (кат. № 10010256 – 288 определений); ВПтест (кат. № 10003329 – 50 определений); Реактив для теста АЦЕТОИН (кат. № 10003369 – 90 определений);

Пособия для идентификации (не входят в набор): Компьютерная программа «Система микробиологического мониторинга «Микроб-2» или

Компьютерные программы «Система микробиологического мониторинга «Микроб-2 и «Микроб-Автомат» (при работе в комплексе совместно с анализатором Мультискан Ассент)

Предупреждение: Тест предназначен только для квалифицированного использования в микробиологической лаборатории.

Строго соблюдать правила работы с инфицированным материалом!

Выделение культуры:

1. Выделите чистую культуру, пользуясь общепринятыми в микробиологии методами на неселективной среде (кровяной агар).
2. 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:

1. Подготовьте суспензию в физиологическом растворе из чистой 24-часовой культуры, тщательно гомогенизируйте ее (мутность должна соответствовать 1 степени по шкале мутности McFarland).
2. При работе с суспензией более высокой или более низкой степени мутности могут быть получены неправильные результаты.
3. 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:

1. Откройте алюминиевую упаковку по сварному шву и достаньте планшет.
2. Возьмите необходимое количество стрипов из пластинки (1 трехрядный стрип содержит 24 теста на одну культуру).

3. 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.

4. Напишите номера штаммов на соответствующие стрипы.

5. 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:

1. Хорошо гомогенизируйте подготовленную суспензию (используйте встряхиватель типа Vortex).

2. Инокулируйте по 0,1 мл суспензии во все лунки, соответствующих трех рядов стрипа.

3. После инокуляции добавьте в лунки H, G, F, E и D первого ряда (тесты URE, ARG, ORN, LYS, H₂S) по 2 капли парафинового масла. Лунки, которые необходимо добавить масло, отмечены на крышке – После использования крышку необходимо обработать этанолом.

4. 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).

5. 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:

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

Учет результатов:

1. Проверьте рост и чистоту культуры на контрольной чашке. При отсутствии роста увеличьте время инкубации еще на 24 часа.
2. 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:

1. Интерпретируйте полученные данные с помощью таблицы в инструкции, книги кодов или программы «Система микробиологического мониторинга «Микроб-2»
2. При окончательной идентификации следует учитывать всю дополнительную информацию (источник выделения, характер колоний, наличие пигмента, микроскопию и другие характеристики).
3. 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. [66]

2.2. Комплекс методов исследования

1. Метод прямого посева на твердую питательную среду (метод Коха).

Питательную среду, приготовленную по рецепту и простерилизованную, переносили в стерильные чашки Петри. Стерильный питательный агар расплавляли в колбе на водяной бане 20-25 минут. Приподняв крышку чашки Петри быстро выливали расплавленный агар-агар и закрывали чашку. Ждали пока агар-агар полностью затвердеет. Параллельно с этим мы делали разведения субстрата для стадии гидролиза при производстве биогаза. В пробирки наливали по 9 мл воды, закрывали марлевыми пробками и автоклавировали. После остывания воды в первую пробирку вносили 1 мл субстрата для стадии гидролиза, перемешивали на вортексе, затем из этой пробирки брали стерильным инсулиновым шприцом 1 мл жидкости и переносили в следующую пробирку. Таким образом мы получили шесть пробирок с разведением субстрата для стадии гидролиза: 0,1; 0,01; 0,001; 0,0001; 0,00001; 0,000001. Посев производили по 0,5 мл в чашки Петри. Посев производили на питательный агар (МПА) и среду Левина. Посев производили для последних трех разбавлений в шести повторностях. После посева чашки помещались в термостат при температуре 20 °C. По истечению 24 часов после посева материал анализировался. Первоначально описывали колонии выросших микробов по следующим признакам: форма, цвет, край, поверхность, диаметр. [21]

2. Микроскопическое изучение морфологии микроорганизмов.

Для более детального изучения клеток микробов использовали фиксированные препараты. Их приготовление складывается из следующих этапов: приготовление мазка, высушивание препарата, его фиксации, окраски, промывки, высушивания. Для этого на чистое предметное стекло в каплю водопроводной воды вносили небольшое количество культуры микроорганизмов, тщательно перемешивали и растирали ее с помощью

микробиологической петли, распределяли мазок по поверхности стекла тонким слоем. Затем препарат высушивали над пламенем спиртовки, не допуская перегрева мазка во избежание свертывания белков протоплазмы бактериальной клетки. После препарат фиксировали, проводя его несколько раз в пламени спиртовки. Затем приступали к окраске, покрывали мазок на 1-2 минуты раствором метиленового синего или карболового фуксина. Промывали препарат струей воды до полного обесцвечивания стекающих капель, высушивали его над пламенем спиртовки, изучали над микроскопом [11].

3. Выделение чистой культуры бактерий.

Чтобы изучить морфологию и форму клеток, необходимо получить чистую культуру исследуемых бактерий. Физиологию, биохимические свойства и циклы развития микроорганизмов исследуют, как правило, при работе с чистыми культурами. Чистой или аксенической, называют культуру, содержащую микроорганизмы одного вида.

Выделение чистой культуры микроорганизмов проводили в три этапа:

- 1) Проводили посев микроорганизмов на жидкие или плотные питательные среды. Сохраняли 24 часа в термостате при определенной температуре.
- 2) Изучали культуральные свойства бактерий. При этом делали замер в проходящем свете, анализировали прозрачность колоний, положение, поверхность колоний. Затем готовили мазки бактерий, окрашивали их по Граму.
- 3) Делали мазки из определенной культуры, выросшей на скошенном агаре, окрашивали их по Граму. О чистоте культуры судят по одноклониальности и однородности.

Затем приступили к изучению биохимических свойств. Обычно основным методом выделения чистых культур микроорганизмов является метод предложенный Р.Кохом. принцип его заключается в получении чистой культуры из отдельной колонии. Однако этот метод не применим для

выделения микроорганизмов, которые не растут или плохо растут на плотных средах. При выделении чистой культуры аэробных микроорганизмов из среды мы часто так делаем. Сначала расплавленную на кипящей водяной бане охлаждали стерильную питательную среду до 50°C, потом разливали агар в стерильные чашки Петри. После того, как питательная среда застывала, из пипетки наносили каплю накопительной культуры на ее поверхность, стерильным стеклянным шпателем Дригальского распределяли каплю по поверхности плотной среды в чашке Петри. Далее этим же шпателем проводили по поверхности среды еще в 2-3 чашках. Обычно в первых двух чашках наблюдали рост микроорганизмов, тогда как в последующих – наблюдали рост изолированных колоний.

В целях дальнейшего исследования бактерий, рассеивали накопительную культуру бактериологической петлей методом истощающего штриха. В этом случае накопительную культуру или ее разведения отбирали петлей и на поверхности плотной среды проводят штрихи. Перед каждым новым штрихом петлю стерилизовали в пламени горелки.

После посева всех чашек Петри помещали их в термостат крышками вниз, чтобы конденсационная вода (образовавшаяся на крышке чашки при застывании агара) не помешала получить изолированные колонии. Чашки выдерживали в термостате 1-7 суток, длительность времени проращивания выбирали в зависимости от скорости роста микроорганизмов согласно литературным данным. Выросшие изолированные колонии отсеивают петлей на поверхность скошенной плотной среды в пробирке или в жидкую среду [28].

4. Окраска бактерий по Граму.

Способ окраски по Граму является необходимым диагностическим методом в микробиологической практике. Сущность дифференцированной окраски по Граму состоит в том, что краски трифенилметанового ряда, например генциановый фиолетовый и йод образуют в клетках некоторых

бактерий окрашенные соединения, которые не обесцвечиваются при последующей обработке препарата спиртом и сохраняют сине-фиолетовую окраску (грамположительные). Другие бактерии не обладают свойством удерживать краску и при обработке спиртом обесцвечиваются (грамотрицательные). Отношение к окраске по Граму служит одним из основных морфологических признаков бактерий в их характеристике.

Способность бактериальных клеток окрашиваться по Граму зависит главным образом от химического состава и структуры клеточных стенок. У грамположительных бактерий клеточная стенка состоит в основном из муреина (95%) и тейхоевой кислоты. В состав клеточной стенки грамотрицательных бактерий входят липопротеиды, липополисахариды, фосфолипиды и незначительное количество муреина (5%).

На предметном стекле готовили и фиксировали мазок культуры бактерий. На мазок клали полоску фильтровальной бумаги и наносили краситель – генциановый фиолетовый. Через 1-2 минуты снимали бумагу и, не промывая мазок водой, наносили на препарат раствор йода. Через 1 минуту действовали на мазок 96%-ным спиртом. Через 1 минуту промывали мазок водой, после этого дополнительно окрашивали раствором фуксина, через 0,5 минуты промывают мазок водой и высушивали над пламенем спиртовки. Готовый препарат изучали под микроскопом с иммерсионной системой. Грамположительные бактерии окрашиваются в сине-фиолетовый цвет, грамотрицательные – в розовый [7,31].

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Исследование общей микробной заселенности субстрата

Состав микрофлоры субстрата определяли методом десятичных разведений в автоклавированных пробирках с водопроводной водой, посев общей и селективной питательной среды проводили на стерильных чашках Петри, из трёх высших разведений в трёхкратной повторности. В своих исследованиях мы использовали следующие среды: мясопептонный агар (МПА), среда Левина.

Посевы поместили в термостате и инкубировали при температуре 32 °С в течение 48 часов. На рис. 3.1. показаны колонии, выросшие на среде Левина.

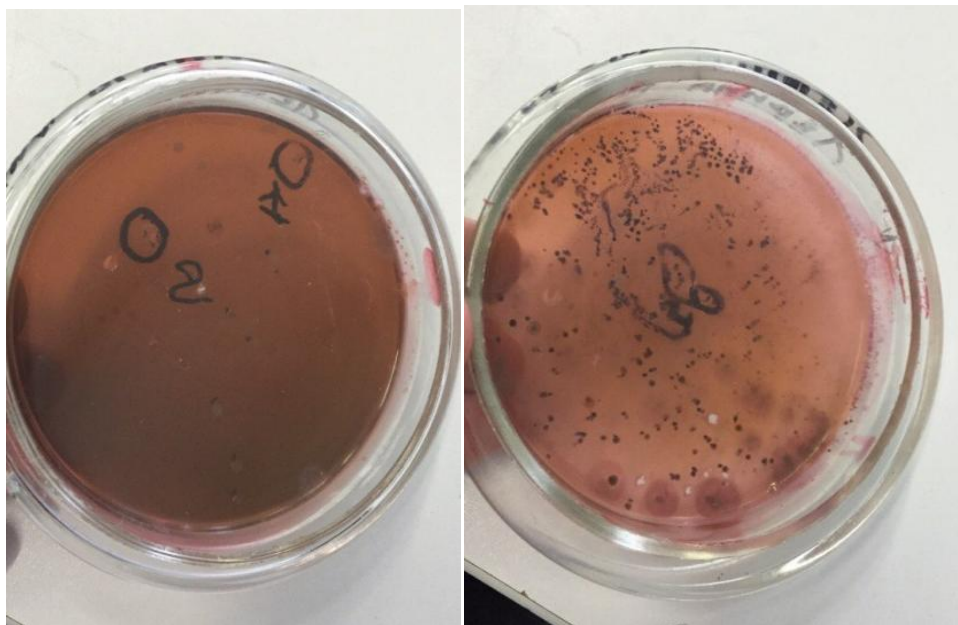


Рис. 3.1. Колонии микроорганизмов на агаре Левина (слева разведение 1×10^{-6} , справа – 1×10^{-5})

Таблица 3.1.

Численность микроорганизмов выросших на среде Левина после 48 часов инкубации в термостате

Разведение	Повторности		
	1	2	3
1×10^{-4}	750	740	751
1×10^{-5}	563	545	574
1×10^{-6}	200	214	221

На рис. 3.2. показаны колонии, выросшие на среде МПА.

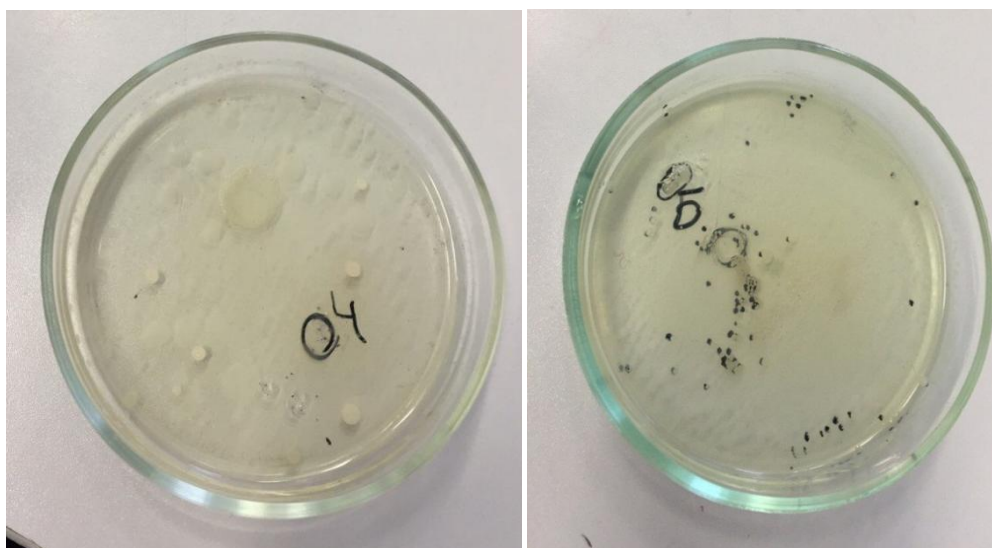


Рис. 3.2. Колонии микроорганизмов на МПА (слева разведение 1×10^{-6} , справа – 1×10^{-5})

Таблица 3.2.

Численность микроорганизмов выросших на МПА после 48 часов инкубации в термостате

Разведение	Повторности		
	1	2	3
1×10^{-4}	750	741	712
1×10^{-5}	564	542	531
1×10^{-6}	250	241	230

3.2. Выделение бактерий в чистую культуру

Качественный анализ родового состава бактериальной флоры определяли по морфологическим признакам колоний на твердых питательных средах и клеток на микропрепаратах.

Мы обнаружили микроорганизмы следующих родов: *Proteus*, *Edwardsiella*, *Xenorhabdus*, *Providencia*, *Photorhabdus*, *Hafnia*, *Yersinia*.

Бактерии исследовали до рода и пересеяли в чистую культуру (рис. 3.3).

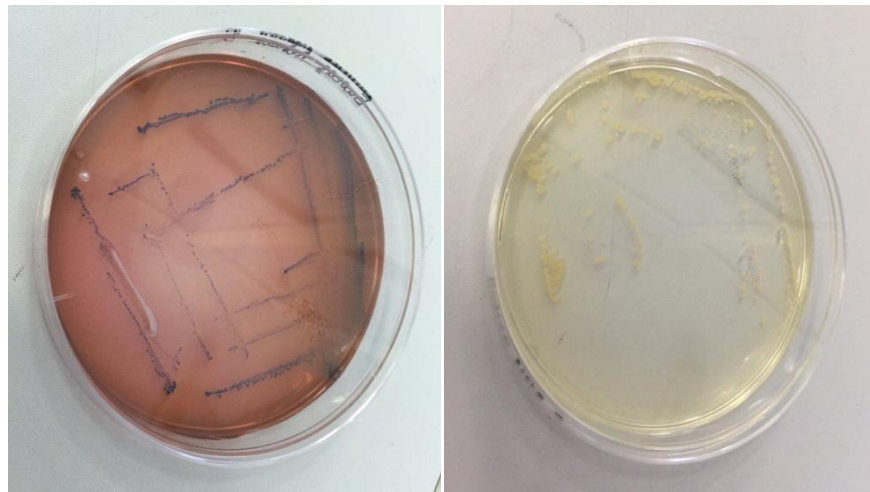


Рис. 3.3. Колонии чистых культур на среде Левина и МПА

3.3. Определение до вида биохимическим тестом

Мы провели ряд биохимических тестов ENTEROtest 24, с помощью которых определили бактерии до вида (рис. 3.4.).

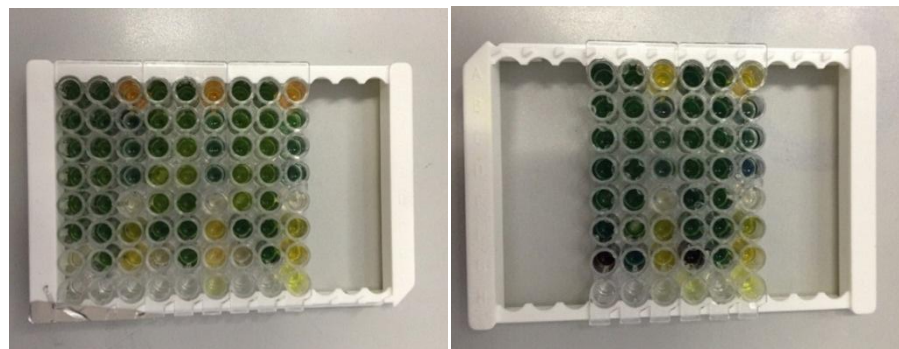


Рис. 3.4. Проведение биохимических тестов

В результате проведенного теста, мы обнаружили бактерии вида *Proteus penneri* в процентной вероятности 91,23 %, где 100% - полное соответствие виду (рис. 3.5.).

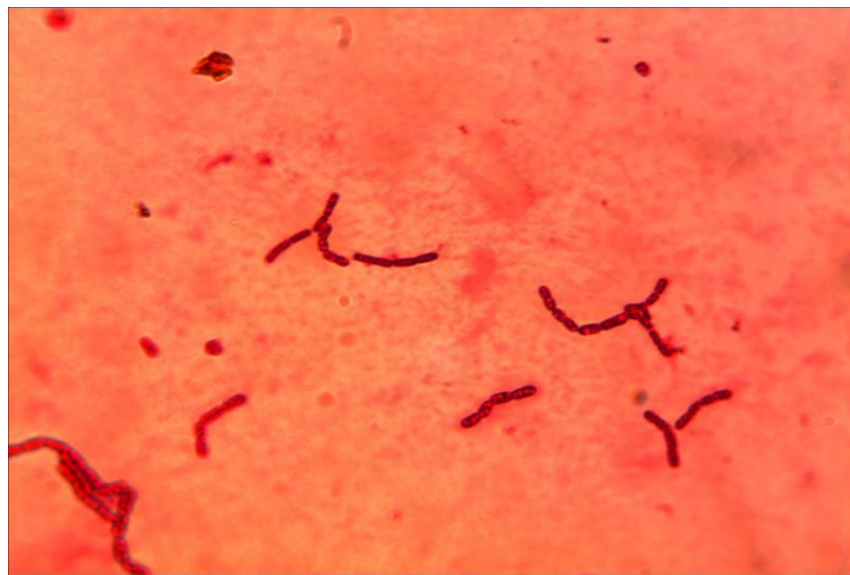
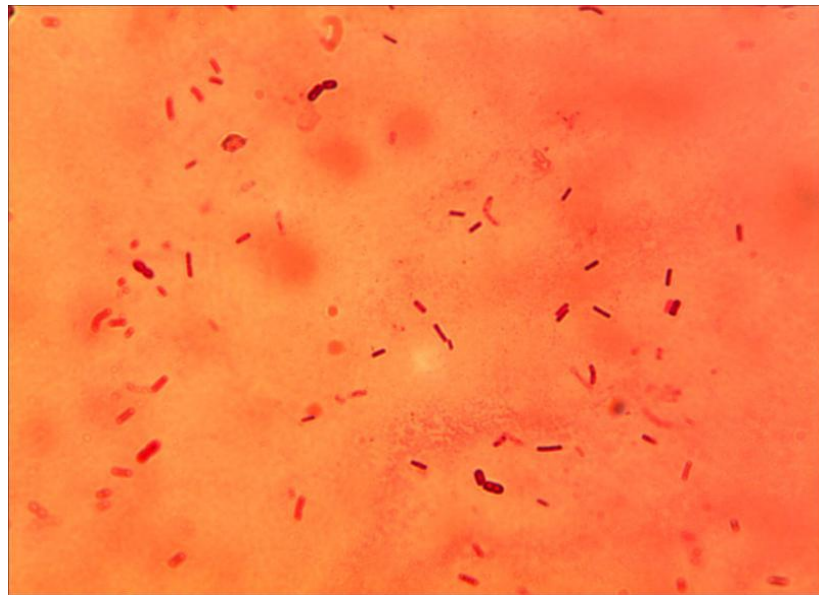


Рис. 3.5. Микрофотографии вида *Proteus penneri*. Среда Левина

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сегодня биоэнергетика считается одним из наиболее перспективных видов ВИЭ в России. Все более привлекательным ее сегментом для инвесторов становится производство биогаза, которое может предоставить дополнительные источники дохода от продажи органических удобрений и сокращения платы за безопасную утилизацию органических отходов. Одним из наиболее перспективных направлений исследований сегодня стали проекты оценки потенциала и применения биогазовых технологий в промышленности. Это связано и со сложившейся на рынке энергетики конъюнктурой, и со свойствами биогаза. Биогаз состоит из метана (55–85%) и углекислого газа (15–45%), теплота сгорания составляет от 21,0 до 27,2 МДж/м³. По теплоте сгорания 1 м³ биогаза эквивалентен 0,8 м³ природного газа, 0,7 кг мазута, 0,6 кг бензина, 1,5 кг дров (в абсолютно сухом состоянии), 3 кг навозных брикетов.

Производство биогаза обеспечивает и достижение технологической гибкости: его использование дает возможность получения одновременно нескольких видов энергоресурсов: газа, моторного топлива, тепла, электроэнергии.

По сути самого процесса - получения биогаза из органического субстрата - перевод труднодоступной энергии химических связей сложных органических соединений в более доступную для человеческой деятельности форму энергии. Основная характеристика данного типа преобразования веществ, общая для всех стадий образования биогаза – необходимость присутствия ферментов, вырабатываемых различными микроорганизмами.

Начало любого процесса - очень важный фактор, проанализировав доступную нам литературу мы обнаружили, что отсутствуют данные об описании бактерий, которые первоначально преобразуют органический субстрат на самой начальной стадии образования биогаза.

Со стадии ферментативного гидролиза, зависит успешность работы биогазовой станции т.к. она дает первостепенный и мощный толчок для последующих фаз получения биогаза.

В результате исследования количественного и качественного состава микрофлоры растительных субстратов смешивающего резервуара БГС «Лучки», мы обнаружили значительное видовое разнообразие микрофлоры.

В ходе исследовательской работы были обнаружены бактерии рода *Proteus* и определены до вида.

На основании проведенной работы были сделаны следующие выводы:

1. Бактерии рода *Proteus* играют важную роль в стадии гидролиза, являясь продуцентами ферментов (энзимов), которые расщепляют преимущественно субстраты содержащие большое количество углеводов.
2. На стадии ферментативного гидролиза большие органические молекулы биodeградируют под действием энзимов, для их дальнейшего использования другими видами микроорганизмов в процессе метаногенеза, в качестве источника органических веществ.
3. В результате исследовательской работы мы выяснили, что разные виды растительных субстратов в начальной стадии гидролиза содержат одинаковое, сопоставимо равному, количество бактерий рода *Proteus*. Это можно рассматривать как свидетельство важной роли бактерий рода *Proteus* в деструкции органических веществ.
4. При помощи биохимического теста ENTEROtest 24, нами были определены бактерии рода *Proteus* до вида *Proteus penneri* с вероятностью 91,23 %.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андреева Л.С. Применение биогазовой технологии для переработки отходов // Инновации в науке. 2013. № 26. С. 35-39;
2. Андреева Л.С. Энергетический поворот - шанс для экологических отраслей // Инновации в науке. 2013. № 17. С. 19-23;
3. Аниева А.Г., Масленникова С.М., Курбанова М.Г., Гаазе З.В. Теоретико-методологические аспекты технико-экономической оценки производства биогаза из отходов сельского хозяйства / Аграрный вестник Урала. – 2013. – № 8 (114). – 115 с;
4. Баадер Б., Доне Е., Бренндерфер М. Биогаз. Теория и практика / Перевод с нем. и предисловие Серебряный М.И., –М.: Колос, 1982. –148 с;
5. Бабаев В.Н., Горох Н.П., Коринько И.В. Энергетический потенциал метанообразования при мезофильном анаэробном разложении органической составляющей отходов // Восточно-Европейский журнал передовых технологий. 2011. Т. 4. № 6 (52). С. 59-65;
6. Бичелдей Т.К. Биогаз как антропогенный фактор воздействия на человека // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Экология и безопасность жизнедеятельности. 2010. № 3. С. 60-64;
7. Вавилин В.А. Как эффективно получать биогаз ? // Природа. 2008. № 11. С. 14-19;
8. Василев Р.Г. Биотопливо: Биодизель, биоэтанол, биогаз // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. – 2007.Т.3. - №№ 1-3. -33 с;
9. Вильданов Ф.Ш., Латыпова Ф.Н., Чанышев Р.Р., Николаева С.В. Успехи развития мировой биогазовой индустрии // Башкирский химический журнал. 2011. Т. 18. № 1. С. 29-36.
10. Винаров А.Ю., Соколов Д.П., Смирнов В.Н., Робышева З.Н. Оптимизация процесса сбраживания отходов животноводства при использовании метано-

- генерирующей микробной ассоциации // Сельскохозяйственная биология. 2013. № 6. С. 27-35;
11. Винников А.В., Кондратенко Ю.Е., Попучиева М.А. Перспективы биогазоустановок в сельскохозяйственном производстве // Инновационная наука. 2015. № 10-1. С. 49-51;
12. Виноградов А.Ю., Кухаренко А.А., Дирина Е.Н. Эффективность направленной переработки растительного сырья в биотопливо. Экология и промышленность. – М.: Москва, 2008. – 18 с;
13. Воробьев А.В., Быков А.С., Пашков Е.П., Рыбакова А.М. Микробиология. – М.: Медицина, 1998. – 336с;
14. Воробьева Л.И. Промышленная микробиология. – М.: Высшая школа, 1989. – 293с;
15. Германович В., Турилин А. - Альтернативные источники энергии. Практические конструкции по использованию энергии ветра, солнца, воды, земли, биомассы / – СПб.: Наука и Техника, 2011. С. 180-186;
16. Гусев М.В., Минеева Л.А. Микробиология. – М.: Изд-во МГУ, 1992. – 448с;
17. Гусев М.В., Минеева Л.А. Микробиология. – М.: Академия, 2007. – 55 с;
18. Долинский А.А., Курис Ю.В., Гуревич Н.А. Современная методика определения равновесных продуктов сгорания биоэнергетических топлив // Техника и оборудование для села. 2013. № 8 (194). С. 46-48;
19. Друзянова В.П., Петров Н.В. Перспективы использования биогаза в двигателях внутреннего сгорания // Технические науки - от теории к практике. 2012. № 15. С. 47-51;
20. Дружинин П.В., Щербак А.П. Уменьшение накопления отходов и развитие альтернативной энергетики // Север и рынок: формирование экономического порядка. 2014. № 6 (43). С. 82-86;
21. Джамалова Г.А. Интенсификация анаэробного разложения модельных образцов твердых бытовых отходов в биореакторах // Известия Санкт-

- Петербургского государственного технологического института (технического университета). 2014. № 23. С. 84-86;
22. Егорова Т.А., Клунова С.М.. Основы биотехнологии. – М.: Академия, 2003 – 207с;
23. Елисеева Е.М., Гордин А.А., Тарасов И.В., Молчанова И.В. Современное состояние мирового производства биотоплива второго поколения из растительного сырья и отходов деревообработки // Экология промышленного производства. 2013. № 1 (81). С. 60-63;
24. Елохин В.Р., Евтеев В.К. Имитационное моделирование процессов в биотехнологических системах // Вестник Иркутского государственного технического университета. 2013. № 11 (82). С. 271-279;
25. Жданов В.М. Занимательная микробиология. – М.: Знание, 1967. – 192 с;
26. Ишков А.Г., Пыстина Н.Б., Аكوпова Г.А., Юлкин Г.М. Роль биогаза в современной энергетике // Территория Нефтегаз. 2014. № 5. С. 130-138;
27. Кадысева А.А., Гильмутдинов Р.М., Тарапатова А.С., Токарев В.В., Безухова С.В. Влияние температуры на анаэробное сбраживание органического субстрата // Вестник Омского государственного аграрного университета. 2013. № 3 (11). С. 35-38;
28. Ковалев А.А., Ковалев Д.А. Материальный и тепловой баланс биогазовой установки с применением газификации смеси твердой фракции навоза с растительными отходами // Инновации в сельском хозяйстве. 2014. № 3 (8). С. 190-194;
29. Красникова Л.В. Микробиология: учебное пособие. — СПб.: Троицкий мост, 2012. — 296 с;
30. Кононенко С.И., Ледин Н.П., Мурадова Е.Л. Производство биогаза и удобрений на животноводческих фермах // Вестник аграрной науки Дона. 2013. № 1 (21). С. 45-53;
31. Корзникова М.В., Блохин А.Ю., Козлов Ю.П. Оценка степени конверсии органического вещества отходов животноводства и птицеводства в биогаз (на

- примере РФ) // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2008. № 2. С. 108-111;
32. Королев С.А., Майков Д.В. Информационно-аналитическая система проектирования структуры, расчета и оптимизации технологических и экономических параметров биогазовых комплексов // Интеллектуальные системы в производстве. 2013. № 2 (22). С. 198-202;
33. Костромин Д.В. Обоснование выбора и применения технологии улучшения потребительских свойств биогаза // Известия Нижневолжского агроуниверситетского комплекса: Наука и высшее профессиональное образование. 2012. № 4. С. 197-202;
34. Костромин Д.В., Медяков А.А., Новиков П.С., Гайнуллин Р.Х., Виноградов Д.В. Обоснование структурированных нанокаталитических систем преобразования энергии биогаза в тепловую // Вестник Рязанского государственного агротехнологического университета им. П.А. Костычева. 2013. № 2 (18). С. 59-63;
35. Курис Ю.В. Исследование процесса перемешивания субстрата в биоэнергетической установке // Техника и оборудование для села. 2013. № 6. С. 39-41
36. Курис Ю.В. Методологические основы анаэробного сбраживания биомассы сельскохозяйственных животных // Техника и оборудование для села. 2013. № 7. С. 41-45;
37. Курис Ю.В., Майстренко А.Ю., Ряснова Е.В. Систематизация аспектов мирового использования биомассы // Вісник СевНТУ. 2011. № 119. С. 158-163;
38. Любинская Т.В., Орлова В.С., Любинский В.С. Получение кормового белка из биогаза полигона ТБО // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Экология и безопасность жизнедеятельности. 2013. № 2. С. 100-104;
39. Майстренко А.Ю., Курис Ю.В., Власенко В.Н. Эффективность способов повышения получения биоэнергетического топлива // Энергосбережение. Энергетика. Энергоаудит. 2010. № 4 (74). С. 48-55;

40. Масликов В.И. Биогаз - перспективный источник энергии // Твердые бытовые отходы. 2006. № 8. С. 32-33;
41. Матрунчик А.С. Потенциал использования биоэнергетики на животноводческих фермах России // Вопросы современной науки и практики. Университет им. В.И. Вернадского. 2015. № 2 (56). С. 22-27;
42. Микробиология биогазовых производств/ Настольная книга ООО «Альт Энерго», 2012. – 22 с.
43. 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;
44. Мишустин Е.Н., Емцев В.Т. Микробиология. – М.:Агропромиздат, 1987. – 94 с;
45. Нетрусов А.И., Котова И.Б. Общая микробиология, - М.: Академия, 2007. – 97 с;
46. Оболенский Н.В., Мартьянычев А.В., Вандышева М.С. Способ получения биогаза и удобрения // Карельский научный журнал. 2015. № 1 (10). С. 157-159;
47. Определитель бактерий Берджи в 2-х т. Пер с англ/под редакцией Дж. Хоулта, Н. Крема, П. Снита, Дж. Стейли, С. Уильямса. – М.: - Мир, 1997. – 432 с;
48. Павлов К.В., Гавриш В.И., Ниценко В.С. Биогазовые комплексы: экономическая целесообразность использования в различных регионах и странах мира // Региональная экономика: теория и практика. 2015. № 28 (403). С. 2-14;
49. Пестрикова И.Е., Лопатина Л.Г. Энергия биомассы: перспективы использования биогаза // Динамика систем, механизмов и машин. 2014. № 1. С. 332-336;
50. Петров С.В., Решетникова И.В., Вохмин В.С. Применение электротехнологий при метановом сбраживании отходов // Инженерный вестник Дона. 2012. № 3 (21). С. 55-58;

51. Работнова И.Л. Общая микробиология. – М.: Высшая школа, 1966. – 271 с;
52. Сассон А., Биотехнология: свершения и надежды: Пер. с англ. /Под ред. В.Г.Дебабова. – М.: Мир, 1987. – 411 с;
53. Сергиенко О.И., Кащенко Ю.С., Елистратова А.П. Выбор наилучших доступных технологий получения биоэнергии на основе эколого-экономических критериев // Научный журнал НИУ ИТМО. Серия: Экономика и экологический менеджмент. 2014. № 4. С. 361-374;
54. Сидоренко О.Д., Борисенко Е.Г., Ванькова А.А, Войно Л.И. Микробиология. – М.: ИНФРА-М, 2009. – 287 с;
55. Сидыганов Ю. Н. Барботажное перемешивание в биореакторах анаэробного сбраживания / 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;
56. Синькевич А.Н. Биогаз - альтернативное топливо будущего // Сельскохозяйственные науки и агропромышленный комплекс на рубеже веков. 2013. № 4. С. 226-228;
57. Сиротин А.А. Практикум по микробиологии/ А.А. Сиротин.- Белгород. 2007. – 78 с;
58. Стребков Д. С., Ковалев А. А. Биогазовые установки для обработки отходов животноводства / Техника и оборудование для села. – 2006. – №11. – 28–30 с;
59. Тарханов О.В. Биогаз: логика принятия решений и следствия // Ветеринария, зоотехния и биотехнология. 2013. № 1 (1). С. 50-57;
60. Тарханов О.В. Переработка органики: практика и экономические последствия // Экономика и управление: проблемы, решения. 2012. № 8. С. 24-31;
61. Тихонравов В.С. Ресурсосберегающие биотехнологии производства альтернативных видов топлива в животноводстве/ Научно-аналитический обзор. М.: ФГБНУ «Росинформагротех», 2011. – 52 с;

62. Тупчиева М.И. Внедрение биотехнологий в сельское хозяйство / Вестник Социально-педагогического института. 2011. № 2 (3). С. 102-106;
63. Хамоков М.М., Шекихачев Ю.А., Алоев В.З., Курасов В.С., Темукуев Т.Б. Производственная и энергетическая эффективность использования биогазовой установки // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. 2012. № 76. С. 333-342;
64. 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;
65. Dasonville, F. and Renault, P. (2002). Interactions between microbial processes and geochemical transformations under anaerobic conditions: a review. *Agronomie*. 22: 51-68;
66. 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;
67. 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;
68. 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;
69. 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;
70. Gupta, R., Gupta, N. and Rathi, P. (2004). Bacterial lipases: and overview of production, purification and biochemical properties. *Applied Microbiology Biotechnology*. 64: 763-781;

71. McInerney, M.J., Struchtmeyer, 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;
72. Scholz V., Ellerbrock V. Biomass and Bioenergy. – 2002. – № 23. – 81-82 c;
73. Tan Benilda V. Anaerobic digestion of some fruit processing wastes for biogas production /Alternative Energy Sources VIII. Proc. Secc. Non-Sol/ Energy Sth Miami Int. Conf., Miami Beach. Fla (New York, 14-16 Dec. 1997). – № 1. –1999. – 855-863 c;
74. Zinder, S.H. (1984). Microbiology of anaerobic conversion of organic wastes to methane: recent developments. ASM News. 50: 294-298;
75. 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.