

УДК 573.6:579.222:579.262:579.63

ОБРАЗОВАНИЕ БИОГАЗА МИКРОБНЫМИ СООБЩЕСТВАМИ ПРИ РАЗЛОЖЕНИИ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ И ПИЩЕВЫХ ОТХОДОВ

© 2012 г. Е. А. Цавкелова, М. А. Егорова, Е. В. Петрова, А. И. Нетрусов

Биологический факультет Московского государственного университета им М.В. Ломоносова, Москва, 119992
e-mail: tsavkelova@mail.ru

Поступила в редакцию 24.05.2011 г.

Из 24 образцов, взятых из природных и антропогенных источников, выделено несколько активных анаэробных микробных сообществ, образующих биогаз при разложении целлюлозы и пищевых бытовых отходов (ПБО). При выращивании микробных сообществ на целлюлозе, офисной бумаге и картоне при 37°C без предобработки субстрата выход метана составил 190–260 мл $\text{CH}_4/\text{г}$. В мезофильных условиях биоконверсия использованного бумажного сырья завершалась образованием биогаза с содержанием метана от 47 до 63%, однако скорость образования биогаза была в 1.5–2.0 раза ниже, чем в термофильных условиях. При культивировании микробных сообществ на ПБО в термофильных условиях наиболее стабильные и эффективные из них образовывали 230–353 мл $\text{CH}_4/\text{г}$ с содержанием метана 54–58%. Полученные результаты показали значимость проведенных исследований для разработки технологии биотрансформации бумажного сырья в биогаз и необходимость селекции микробных сообществ для повышения эффективности процесса.

Метаногенез является заключительной стадией процесса разложения органического вещества в анаэробных условиях. Различные группы микроорганизмов способны расщеплять органические соединения до субстратов, участвующих в метаногенезе: ацетата, углекислого газа и водорода, из которых затем может образовываться метан. В углеродном цикле благодаря деятельности микроорганизмов образуется около 1 млрд. т $\text{CH}_4/\text{г}$ [1]. Метан, являясь парниковым газом, отражает тепловые лучи примерно в 25 раз интенсивнее, чем CO_2 [2, 3]. Биогаз, в состав которого входит метан, является одним из основных источников возобновляемого топлива. Интерес к поиску альтернативных энергетических ресурсов объясняется не только постоянным увеличением спроса на энергоносители, но и небезопасностью их применения, неуклонно ухудшающейся экологией, сокращением мировых запасов традиционных видов топлива (нефть, природный газ, каменный уголь, древесина). При этом возобновляемая энергия на сегодняшний день составляет около 14% потребляемой первичной энергии в мире [4].

Биогаз состоит в основном из метана (55–70% CH_4) и углекислого газа (30–45% CO_2), в нем также могут встречаться следовые количества водорода, сероводорода, аммиака, азота, ароматических и галогено-ароматических углеводородов [5]. Биогаз имеет ряд преимуществ перед другими видами альтернативного топлива, в метане заключено примерно в 3 раза больше энергии, чем, например, в биоводородном топливе [6]. Кроме того, для получения биогаза нет необходимости выращивать сельскохозяйственные растения, как

это делается при производстве биодизеля и биоэтанола [4], так как в основном биогаз получают при разложении отходов животноводства (преимущественно навоз крупного рогатого скота) и очистке сточных вод, при которой на конечном этапе происходит образование биогаза в метантенках. Однако, несмотря на то, что анаэробная очистка муниципальных и сельскохозяйственных сточных вод издавна и широко используется, применение технологии получения биогаза из твердых бытовых отходов менее успешно [3]. Субстратом для получения биогаза может быть любая биомасса, а также органическая часть отходов, которую можно подвергнуть биodeградации. Помимо производства энергии и уменьшения загрязнения атмосферы парниковыми газами после процесса анаэробного разложения и образования биогаза оставшаяся масса может быть использована как высококачественное удобрение. Однако для полноценного и повсеместного применения технологий получения биогаза остаются нерешенными вопросы, касающиеся полноты утилизации субстратов, повышения качества и объема продукции биогаза, поддержание стабильности и функциональной активности сообщества микроорганизмов [3].

В образовании биогаза участвует целый комплекс микроорганизмов, принадлежащих нескольким различным группам. Основные процессы, осуществляемые микробным сообществом, — гидролиз полимерных субстратов, сбраживание сахаров и аминокислот, анаэробное окисление, ацетогенез, а также ацетокластический и гидрогеноτροφный метаногенез [7]. При этом состав микробного сообщества, а следовательно и эф-

фективность всего процесса образования биогаза, зависят от состава питательной среды, условий культивирования, температуры, pH и ряда других факторов [8]. Большое количество работ посвящено изучению образования биогаза из навоза сельскохозяйственных животных, осадочного ила сточных вод и разного рода органических отходов, но очень мало информации об использовании такого субстрата, как целлюлоза. При этом целлюлоза и гемицеллюлоза зачастую преобладают в твердых бытовых отходах (ТБО) [9]. В последнее время растет интерес к конверсии бумажного сырья в биогаз [10, 11]. Это связано как с раздельным сбором мусора, так и с тем, что бумага и картон являются наиболее подходящей для биодegradации фракцией ТБО [11, 12]. Однако современный подход к раздельной переработке отходов все еще не является типичным для отечественных производителей и муниципальных служб, поэтому остаются малоизученными микробиологические процессы превращения субстратов и биотехнологические возможности таких производств.

Ранее [13] из 24 различных образцов, взятых из природных и антропогенных экониш, было выделено несколько активных микробных сообществ, разлагающих целлюлозу с образованием биогаза при 55°C. Выделенные микробные сообщества проявляли стабильную функциональную активность на протяжении 5 пересевов в течение более 6 мес.

Цель работы – получение анаэробных микробных сообществ при их культивировании на целлюлозе, офисной бумаге и картоне, а также на пищевых бытовых отходах и сравнение их способности к образованию биогаза в анаэробных условиях при 37°C и 55°C.

МЕТОДИКА

Источники биомассы. Образцы посевного материала отбирали из различных экологических природных и антропогенных ниш: образцы № 1, 2 – компостная куча (Московская обл.), образцы № 3, 4 – жом красного и белого винограда (Дагестан), образец № 5 – помет кролика (Московская обл.), образец № 6 – навоз крупного рогатого скота (КРС) № 1 (Московская обл.), образец № 7 – навоз КРС № 2 (Московская обл.), образцы № 8–13 – пробы из пресноводных термофильных водоемов Камчатки, образцы № 14–18 – иловые и донные отложения прудов и водоемов (Тверская обл.), образцы № 19–23 – навоз зебры, пони, антилопы гну, черной антилопы и слона, соответственно (Зоопарк, Москва), образец № 24 – копролиты дождевых червей (Ботанический сад, Москва).

Культивирование. Выращивание и селекцию активных микробных сообществ, образующих биогаз, проводили на среде следующего состава (г/л дистиллированной воды): K_2HPO_4 – 1.0;

KH_2PO_4 – 1.0; NH_4Cl – 2.5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0.5; $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ – 0.1; $NaCl$ – 0.1; $CaCO_3$ – 1.0; $NaHCO_3$ – 5.0; дрожжевой экстракт – 2.0; пептон – 1.0; раствор микроэлементов – 1 мл; резазурин – 0.5 мг/л; pH 7.0–7.5. Раствор микроэлементов содержал (мг/л дистиллированной воды): $ZnCl_2$ – 70.0; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ – 100.0; $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ – 190.0; H_3BO_3 – 6.0; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ – 36.0; $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ – 2.0; $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ – 24.0; $Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$ – 15.0; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ – 1.0 г/л. Сульфат железа предварительно растворяли в 10 мл 25%-ной HCl. В качестве целлюлозосодержащих субстратов использовали: обеззоленные фильтры МРТУ 6-06-2411-65, офисную бумагу с черно-белой печатью и гофрированный картон в количестве 15 г/л среды, которые предварительно нарезали на кусочки 0.5 см². При использовании пищевых бытовых отходов (ПБО), состоящих из различных растительных и животных компонентов, их предварительно высушивали, размешивали и растирали в ступке до получения кусочков не более 0.5 см². Для определения массы сухого вещества навески субстратов (10 г) высушивали при 105°C.

Посевной материал (30% от общего объема среды) вносили в 30 мл питательной среды во флаконы на 100 мл, которые герметично закрывали резиновой пробкой, закатывали алюминиевым колпачком и замещали воздушную фазу на аргон. Культуры инкубировали в темноте при 55°C в термофильных условиях или при 37°C в мезофильных условиях в термостате, pH среды при необходимости доводили до 7.0 1н. HCl. Хранение культур осуществляли в 25%-ном глицерине в анаэробных условиях при –20°C. Активность микроорганизмов определяли по приросту количества метана в составе биогаза. Стабильность выбранных сообществ проверяли неоднократно пересевом на свежую питательную среду после достижения сообществом максимальной продукции биогаза.

Хроматография. Определение концентраций CH_4 , CO_2 и H_2 осуществляли методом газовой хроматографии на хроматографе Кристалл 2000 М (“Хроматэк”, Россия), оснащенном микрокапиллярной колонкой FFIP (15000 × 0.5 мм), газ-носитель – аргон, расход 15 мл/мин, температура детектора – 200°C, температурный градиент в термостате – от 70 до 160°C. Результаты анализировали с помощью программного обеспечения Chromatec Analytic 2.5 (“Хроматэк”, Россия).

Активность газообразования оценивали, измеряя избыточное давление в герметично закрытых флаконах с культивируемым сообществом. Концентрации газов в смеси и содержание метана определяли при нормальных условиях температуры и давления (1 атм). Все эксперименты проводили в 3–5 повторностях. Данные обрабатывали принятыми методами статистической обработки. Для данных, представленных на рисунках и в таб-

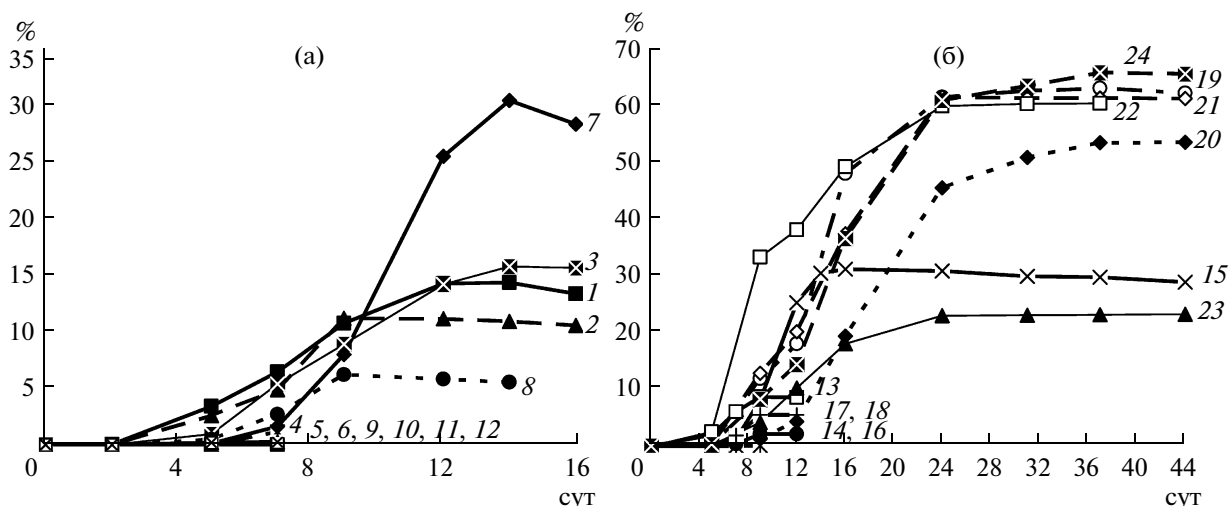


Рис. 1. Динамика образования метана (%) сообществами № 1–12 (а) и 13–24 (б), выращенными при 37°С (первый пассаж).

лицах, отклонение значений от средней величины не превышало 5–10%.

Микроскопия. Для наблюдения за составом микробных сообществ и изменениями, происходящими в процессе культивирования микроорганизмов, использовали оптический световой микроскоп Nikon Eclipse E100 (Япония). Препараты фиксировали, окрашивали водным раствором фуксина в течение 3 мин и рассматривали под иммерсионным маслом при увеличении ×900.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Образование биогаза микробными сообществами из целлюлозосодержащих материалов. С целью отбора эффективных микробных сообществ, способных разлагать целлюлозу в мезофильных условиях (37°С) культивирования, были исследованы 24 пробы из тех же экониш, из которых ранее были выделены термофильные сообщества [13]. Однако большинство культур либо не образовывали биогаз в этих условиях (рис. 1), либо уменьшали продукцию метана при пересевах. Сообщества, выделенные при 55°С, как ранее было показано, (в основном, из навоза травоядных животных) отличались высокой эффективностью конверсии цел-

люлозы в метан: в среднем около 15 ммоль СН₄/г исходного субстрата [13]. При выращивании сообществ в мезофильных условиях выход метана был значительно меньше – от 2–4 до 8–11 ммоль СН₄/г целлюлозы. В ходе отбора только сообщества № 1 и № 21, выделенные из компостной кучи и навоза антилопы гну соответственно, сохранили способность к образованию биогаза на достаточно высоком уровне (табл. 1). Наиболее устойчивым оказалось сообщество № 21, образующее около 11.5 ммоль СН₄/г (или 250–260 мл СН₄/г) целлюлозы. Высокие значения выхода метана в первом пассаже могли быть связаны с высоким содержанием питательных и других биологически-активных веществ в исходном инокуляте (навоз антилопы гну).

Ранее [13], при культивировании пробы № 1 в термофильных условиях не было выделено активного микробного сообщества (кумулятивный выход метана не превышал 38.8%, а эффективность трансформации целлюлозы составила всего лишь 4.9 ммоль СН₄/г целлюлозы), в то время как из пробы № 21 было получено сообщество микроорганизмов, разлагающее целлюлозу с образованием 15.6 ммоль СН₄/г целлюлозы и содержанием метана 58%. Из отдельных образцов и в мезо-

Таблица 1. Накопление метана при выращивании на целлюлозе при 37°С сообществами № 1 и № 21

№ пробы	Показатели выхода метана	1 пассаж	2 пассаж	3 пассаж	4 пассаж	5 пассаж
1	СН ₄ , %	45.87	63.98	47.07	58.25	57.96
	СН ₄ , мл/г	36.49	347.15	202.22	250.20	266.73
	СН ₄ , ммоль/г	1.63	15.49	9.03	11.17	11.91
21	СН ₄ , %	61.40	50.48	63.33	60.78	62.46
	СН ₄ , мл/г	395.51	256.51	246.67	258.17	260.20
	СН ₄ , ммоль/г	17.67	11.45	11.02	11.53	11.62

Таблица 2. Скорость образования биогаза (СОБ) при разложении целлюлозы, офисной бумаги и картона в термофильных (Т) и мезофильных (М) условиях

№	Максимум СОБ, мл CH ₄ /сут мл среды		Максимум СОБ, мл CH ₄ /сут г*		Максимум СОБ, сут	
	Целлюлоза					
	I пассаж	V пассаж	I пассаж	V пассаж	I пассаж	V пассаж
3 Т	1.30	0.76/0.54	86.7	50.7/36.0	5	7/21
4 Т	0.66	0.72	44.0	48.0	7	7
6 Т	0.45/1.30	0.71	30.0/86.7	47.3	5/12	5
7 Т	0.64/0.50	0.48/0.47	42.7/33.3	32.0/31.3	5/14	14/21
17 Т	0.64/0.52	0.72/0.45	42.7/34.7	48.0/30.0	5/14	7/26
18 Т	0.59	0.64/0.48	39.3	42.7/32.0	5	7/21
19 Т	0.91/0.96	0.80	60.6/64.0	53.4	3/14	5
20 Т	1.00	0.82	66.7	54.7	21	5
21 Т	0.93	0.54/0.50	62.0	36.0/33.3	7	5/33
22 Т	1.36	0.90	90.7	60.0	11	12
1 М	0.40	0.46	26.7	30.7	7	8
21 М	0.40/0.35	0.43	26.7/23.3	28.7	8/24	8
	Офисная бумага	Картон	Офисная бумага	Картон	Офисная бумага	Картон
3 Т	0.60	0.66	40.0	44.0	6	7
6 Т	1.00	0.74	66.7	49.3	6	7
17 Т	0.68	0.76	45.3	50.7	3	7
18 Т	0.86	0.70	75.3	46.7	6	7
19 Т	1.00	0.80	66.7	53.3	6	7
20 Т	1.91	0.78	127.3	52.0	3	7
21 Т	0.86	0.82	75.3	54.7	6	7
22 Т	0.84	0.62	56.0	41.3	6	7
1 М	0.60	0.60	40.0	40.0	7	13
21 М	0.49	0.46	32.7	30.7	7	13

фильных, и термофильных условиях культивирования удавалось выделить активные микробные сообщества, способные эффективно использовать целлюлозу с выделением биогаза. В то же время в термофильных условиях было выделено значительно большее количество стабильных сообществ, образующих 55–60% биогаза. В этих условиях образование биогаза проходило эффективнее: ~16 ммоль CH₄/г целлюлозы (358.3 мл CH₄/г) образовывалось за 15–25 сут, в то время как в мезофильных условиях культурам № 1 и 21 понадобилось больше, чем 1.5 мес. для синтеза 260–267 мл CH₄/г.

Изменения скорости образования биогаза (СОБ) при разложении целлюлозы в термофильных и мезофильных условиях представлены в табл. 2. За время селекции изменение этой величины зависело от используемого сообщества, для некоторых она увеличивалась, для других значительно не изменилась. При этом в термофильных условиях СОБ была в 2 и более раз выше, чем в

мезофильных. Для ряда культур было показано наличие двух пиков образования биогаза, причем первый пик приходился у большинства культур на 5–7 сут. Известно, что при высоких температурах и присутствии ингибиторов, таких, как аммоний и летучие жирные кислоты, образование метана происходит в два этапа – ацетат сначала окисляется синтрофными ацетат-окисляющими бактериями до H₂ и CO₂, а затем гидрогенотрофные метаногены переводят эти соединения в метан [14]. При этом ацетокластические метаногены в большей степени чувствительны к изменению (закислению) pH, в то время как гидрогенотрофы способны расти и при низких pH [15].

Бумага и картон, составляющие большую часть городских твердых отходов, являются хорошим материалом для биодegradации [11, 12]. Образование биогаза микробными сообществами, выделенными на целлюлозе, исследовали, выращивая культуры на офисной бумаге и упаковочном гофрированном картоне. При этом наиболее

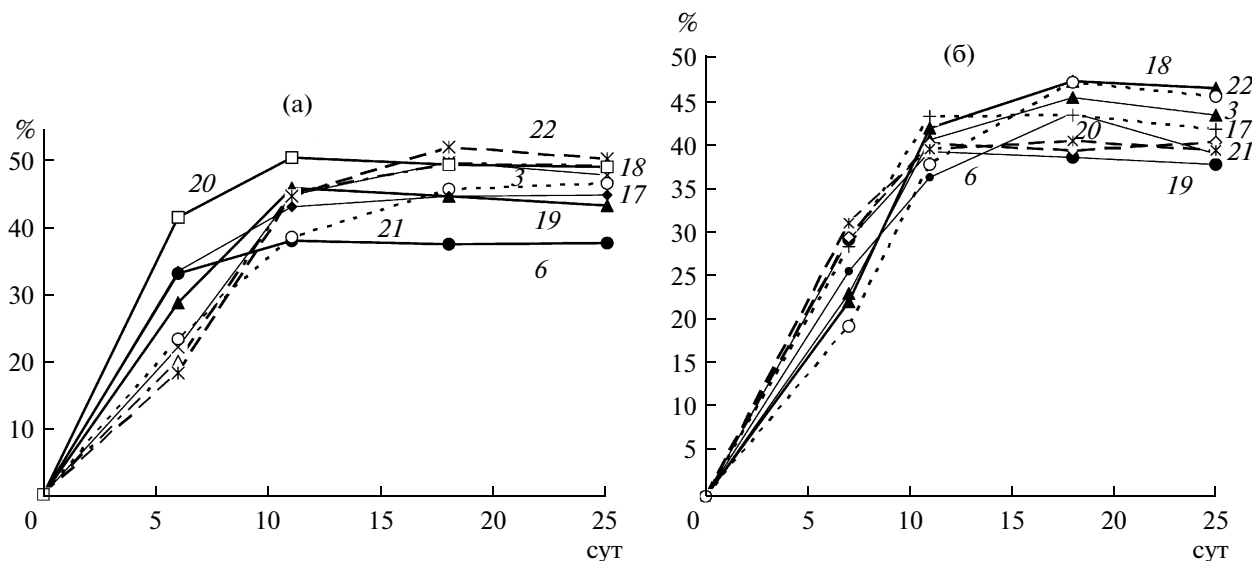


Рис. 2. Динамика образования метана (%) наиболее активными сообществами (№ 3, 6, 17–22) на офисной бумаге с черно-белой печатью (а) и упаковочном картоне (б) при 55°C.

активные сообщества были выделены из различных субстратов: жом красного винограда (№ 3), навоз травоядных животных (№ 6, 20–22) и донные иловые осадки (№ 17, № 18). Сообщества культивировали в термофильных и мезофильных условиях, результаты представлены на рис. 2 и в табл. 2, 3. Отобранные на целлюлозе сообщества оказались эффективными в отношении трансформации бумажного сырья в биогаз. В термофильных условиях при культивировании на офисной бумаге микробные сообщества № 3, 17–22 эффективно осуществляли конверсию субстрата с накоплением метана в биогазе около 50%. При выращивании на упаковочном гофрированном картоне при 55°C также происходил активный гидролиз субстрата с последующим образованием биогаза, хотя и менее эффективно (рис. 2, табл. 3). Из данных литературы известно, что при разложении различного типа бумажного сырья выход метана может составлять на офисной бумаге – 217.3, а на гофрированном картоне от 152.3 до 183.0 мл $\text{CH}_4/\text{г}$ субстрата соответственно [11, 12].

При культивировании микробных сообществ № 1 и № 21 в мезофильных условиях культуры продуцировали 47.3 и 51.7% метана на офисной бумаге и 48.9 и 49.6% на картоне соответственно. Сообщество № 21 образовывало больше метана и осуществляло этот процесс эффективнее (табл. 3). В мезофильных условиях биоразложение картона проходило не менее активно, чем при 55°C, однако с меньшей скоростью. Тем не менее в мезофильных и термофильных условиях выбранные микробные сообщества сохраняли свою активность при разложении бумажного сырья и трансформации его в биогаз. Причем биodeградация исследуемых субстратов проходила без предварительной их обработки, т.е. кислотного или щелоч-

ного гидролиза, применяемого для разрушения лигнина, который с трудом подвергается деградации в анаэробных условиях и уменьшает доступность целлюлозы для гидролиза [11]. Содержание лигнина в таких субстратах колеблется от 2% в офисной бумаге до 24% в газетной [16].

Скорость образования биогаза сообществами микроорганизмов в термофильных условиях на офисной бумаге (~0.9–1.0 мл/сут мл среды) была выше, чем на целлюлозе за исключением сообществ № 3 и № 17. Наибольший выход биогаза (в культуре № 20) составил почти 2.0 мл/сут мл среды. Максимальная СОБ при разложении офисной бумаги и картона была отмечена в большинстве культур на 6–7 сут за исключением культур № 17 и 21, которые осуществляли биоконверсию за 3 сут. При разложении картона СОБ была несколько ниже (табл. 2). Несмотря на то, что в мезофильных условиях биоконверсия бумажного сырья протекала с образованием биогаза, СОБ была в 1.5–2 раза ниже, чем в термофильных условиях.

Исследование динамики образования биогаза показало, что первоначально возрастали концентрация и давление водорода, которые снижались по мере развития гидрогенотрофов. Затем снижение рН, вызванное образованием большого количества летучих жирных кислот (ЛЖК) в процессе гидролиза целлюлозы, ингибировало метаногенез. Увеличение рН способствовало образованию из уксусной кислоты метана и увеличению его концентрации и давления. Сходные процессы, протекающие при биоразложении целлюлозы и офисной бумаги в мезофильных условиях, описаны также в работе [10]. Таким образом, при проведении селекции микробных сообществ и адаптации их к субстрату удалось значительно увели-

чить выход метана в составе биогаза, причем одинаково эффективно как в термофильных, так и в мезофильных условиях культивирования.

Образование биогаза микробными сообществами, разлагающими пищевые бытовые отходы. Проведено сравнение образования биогаза выделенными сообществами при использовании в качестве субстрата ПБО. Микробные сообщества выделяли при 55°C, поскольку наиболее эффективная биоконверсия органического вещества происходила именно в термофильных условиях (первый пассаж), при этом большинство сообществ образовывало более 50% метана в составе газовой смеси (рис. 3). Отличительной чертой продукции биогаза на этом субстрате было то, что ряд сообществ, например № 15, № 21, № 23, выделял на первых этапах культивирования значительное количество водорода – 5.95; 4.24; 4.72% соответственно, который затем вовлекался в метаногенез. Было отобрано несколько активных микробных сообществ, которые эффективно перерабатывали органические отходы в биогаз (табл. 4) и не снижали эффективности биоконверсии в процессе пересевов. Максимальная скорость образования метана (7 сут культивирования) для сообществ № 2, № 3, № 19 и № 23 составила 0.60, 0.88, 0.43 и 0.44 мл/сут мл среды соответственно. Сообщества, выделенные из компостной кучи (№ 2) и жома красного винограда (№ 3), оказались наиболее активными в отношении разложения ПБО – 353 и 313 мл $\text{CH}_4/\text{г}$ соответственно, с содержанием метана в биогазе 58%. По данным Р. Джанга с соавт. [17], при анаэробной микробной деструкции (в течение 28 сут при 50°C) пищевых отходов предприятий общественного питания (рестораны) выделялось до 440 мл метана/г. Другие авторы [18], исследуя разложение различных видов пищевых отходов в мезофильных и термофильных условиях за то же время показали, что выход метана при этом не зависел от условий культивирования и выбранных разновидностей субстрата. Так, при конверсии в биогаз отходов от производства супов, отходов из кафетерия и кухни коммерческого заведения содержание метана в мезофильных условиях составило от 250 до 450 мл/г, а в термофильных – 240–470 мл/г. Наибольшее количество метана (более 500 мл $\text{CH}_4/\text{г}$) образовывалось лишь при разложении отходов от рыбных производств и жиров из маслоотделительного сборника (жироловка). Тем не менее, из-за неоднородности таких субстратов следует учитывать, что показатели выхода метана могут изменяться в зависимости от типа органического субстрата и состава микробного сообщества. Все выделенные нами сообщества эффективно образовывали биогаз из целлюлозы и органических отходов, а селекция микробных сообществ позволила получить результаты, сравнимые или превышающие показатели выхода метана на аналогичных субстратах [11, 12, 17, 18].

Таблица 3. Накопление метана при культивировании микробных сообществ на офисной бумаге и картоне в термофильных (Т) и мезофильных (М) условиях

№ пробы	Показатели выхода метана	Офисная бумага	Картон
3 Т	CH_4 , %	51.25	50.13
	CH_4 , мл/г	247.95	223.44
	CH_4 , ммоль/г	11.07	9.97
6 Т	CH_4 , %	48.61	48.02
	CH_4 , мл/г	241.14	231.52
	CH_4 , ммоль/г	10.76	10.33
17 Т	CH_4 , %	48.61	51.02
	CH_4 , мл/г	246.60	252.43
	CH_4 , ммоль/г	11.00	11.27
18 Т	CH_4 , %	49.78	49.33
	CH_4 , мл/г	259.05	244.49
	CH_4 , ммоль/г	11.57	10.92
19 Т	CH_4 , %	49.09	47.91
	CH_4 , мл/г	270.88	234.26
	CH_4 , ммоль/г	12.09	10.43
20 Т	CH_4 , %	50.33	48.70
	CH_4 , мл/г	281.80	241.79
	CH_4 , ммоль/г	12.58	10.79
21 Т	CH_4 , %	48.77	50.12
	CH_4 , мл/г	255.84	240.28
	CH_4 , ммоль/г	11.42	10.72
22 Т	CH_4 , %	50.41	50.04
	CH_4 , мл/г	265.35	246.98
	CH_4 , ммоль/г	11.85	11.02
1 М	CH_4 , %	47.32	48.90
	CH_4 , мл/г	211.38	193.65
	CH_4 , ммоль/г	9.43	8.64
21 М	CH_4 , %	51.69	49.63
	CH_4 , мл/г	245.50	240.88
	CH_4 , ммоль/г	10.96	10.75

Известно, что метаногенное микробное сообщество объединяет различные виды бактерий и архей, тесные взаимоотношения между которыми базируются, прежде всего, на пищевых потребностях [19, 20]. При анализе как термофильных [13], так и мезофильных сообществ, разлагающих целлюлозу, нами были отмечены различия в составе культур, в том числе на начальных и конечных этапах (пассажи) их селекции. В сообществах обнаружены клетки различных морфотипов, а также большое количество споровых форм, что может указывать на присутствие клостридий, которые обычно широко представлены в анаэробных сообществах, участвующих в гидролизе целлюлозы [21]. Больше микробное разнообразие наблюдали в термофильных сообществах,

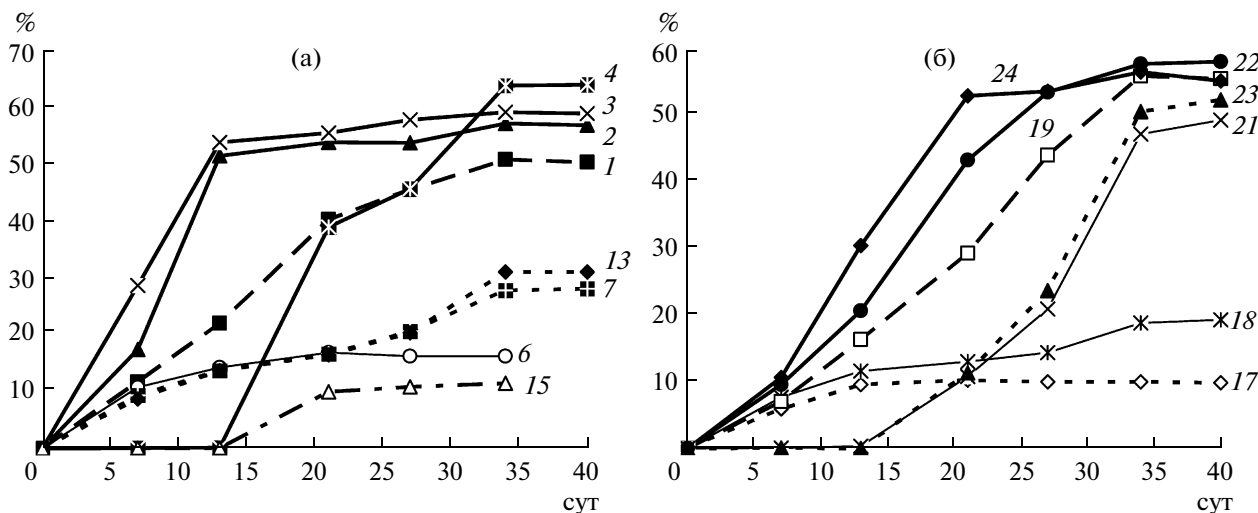


Рис. 3. Динамика образования метана (%) на ПБО при 55°C (первый пассаж) избранными микробными сообществами: № 1–4, 6, 7, 13, 15 (а) и № 17–19, 21–24 (б).

разлагающих ПБО, что определяется присутствием различного типа субстратов (белки, жиры, углеводы, целлюлозосодержащие компоненты). Было отмечено, что микробные клетки адгезировались на частицах субстрата и волокнах целлюлозы. Известно, что способность к адгезии является важной особенностью анаэробных гидролитиков (в том числе целлюлозолитиков). К. О’Саливан с сотр. [22] показал, что способность микробного сообщества к гидролизу органического вещества в большей степени определяется не гидролитической способностью отдельных, составляющих сообщество микроорганизмов, а именно активностью гидролитиков, способных адгезироваться на субстрате.

Изученные нами микробные сообщества способны обеспечить высокий выход метана в составе биогаза как в мезофильных, так и в термофильных [13] условиях культивирования. Несмотря на то, что пищевые отходы быстрее подвергались биоразложению, целлюлоза и ее производные

оказались не менее эффективными источниками получения биогаза. Кроме того, сообщества, выделенные на целлюлозе, проявляли большую стабильность при пересевах в течение нескольких мес. Необходимо отметить, что среда для культивирования не содержала дорогостоящих компонентов, а субстрат не подвергался предварительной обработке, что расширяет возможности использования целлюлозосодержащих субстратов. Известно, что термофильная анаэробная деструкция органических веществ проходит более эффективно и требует меньше времени [23–25]. Термофильные установки показывают более высокий выход биогаза, большую скорость его образования, больший коэффициент конверсии и могут быть загружены большим количеством субстрата [24, 26]. Кроме того, при высоких температурах подавляются патогенные микроорганизмы (например, *E. coli* и *Salmonella* spp.) и паразиты (яйца гельминтов) [27–29]. В то же время при мезофильном режиме получения биогаза меньше энергозатраты, а про-

Таблица 4. Накопление метана при культивировании микробных сообществ № 2, 3, 19, 23 на ПБО при 55°C

№ пробы	Показатели выхода метана	1 пассаж	2 пассаж	3 пассаж	4 пассаж	5 пассаж
2	CH ₄ , %	58.88	45.34	62.00	61.20	58.08
	CH ₄ , мл/г	350.17	188.08	303.86	261.85	352.91
	CH ₄ , ммоль/г	15.63	8.40	13.57	11.70	15.76
3	CH ₄ , %	60.88	52.18	62.96	63.56	57.73
	CH ₄ , мл/г	486.92	247.02	323.86	333.38	313.28
	CH ₄ , ммоль/г	21.74	11.03	14.46	14.88	14.00
19	CH ₄ , %	54.50	47.47	60.88	56.55	54.60
	CH ₄ , мл/г	252.03	197.12	223.34	182.31	230.75
	CH ₄ , ммоль/г	11.25	8.80	9.97	8.14	10.30
23	CH ₄ , %	52.71	47.22	62.92	56.64	54.5
	CH ₄ , мл/г	227.41	212.12	224.36	182.57	250.11
	CH ₄ , ммоль/г	10.15	9.47	10.02	8.15	11.16

цесс в меньшей степени ингибируется образованием аммиака и ЛЖК [24], поэтому в зависимости от требований необходимо подбирать оптимальное микробное сообщество, позволяющее с максимальной эффективностью перерабатывать органический субстрат в биогаз. Полученные нами данные необходимы для понимания и оценки различных стратегий, которые можно применять для утилизации и более эффективного использования твердых органических отходов, в том числе, содержащих целлюлозу.

Работа выполнена при поддержке гранта ФЦП "Научные и научно-педагогические кадры инновационной России" на 2009–2013 годы; ГК № П2470.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Thauer R.K.* // Microbiology. 1998. V. 144. № 9. P. 2377–2406.
2. *Rodhe H.* // Science. 1990. V. 248. № 8. P. 1217–1219.
3. *Bochiwal C., O'Malley C., Chong J.P.J.* Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology / Ed. K.N. Timmis. Berlin: Springer, 2009. P. 2810–2815.
4. *Antizar-Ladislao B., Turrión-Gómez J.L.* // Biofuels, Bioprod. Bioref. 2008. V. 2. P. 455–469.
5. *Паничева Е.С., Давиденко Е.В.* // Биотехнология. 1990. Т. 6. № 4. С. 49–53.
6. *Ferry J.G.* // Curr. Opin. Biotechnol. 2011. V. 22. P. 351–357.
7. *Stams A.J.M.* // Antonie van Leeuwenhoek. 1994. V. 66. № 1–3. P. 271–294.
8. *Levén L., Eriksson A.R.B., Schnurer A.* // FEMS Microbiol. Ecol. 2007. V. 59. № 3. P. 683–693.
9. *Clarke W.P.* // Waste Manage. Res. 2000. V. 18. № 6. P. 510–524.
10. *Qu X., Vavilin V.A., Mazeas L., Lemunier M., Duquenois C., He P., Bouchez T.* // Waste Manag. 2009. V. 29. № 6. P. 1828–1837.
11. *Pommier S., Mañas L.A., Lefebvre X.* // Biores. Technol. 2010. V. 101. P. 463–468.
12. *Eleazer W.E., Odle W.S., Wang Y.S., Barlaz M.A.* // Environ. Sci. Technol. 1997. V. 31. № 3. P. 911–917.
13. *Цавкелова Е.А., Егорова М.А., Петрова Е.В., Нетрусов А.И.* // Вестник МГУ. Сер. биол. 2012. № 4.
14. *Schnurer A., Svensson B., Schink B.* // FEMS Microbiol. Lett. 1997. V. 154. № 2. P. 331–336.
15. *Kim I., Hwang M., Jang N., Hyun S., Lee S.* // Int. J. Hydrogen Energy. 2004. V. 29. № 11. P. 1133–1140.
16. *Barlaz M., Ham R.K., Shaefer D.M.* // CRC Crit. Rev. Environ. Control. 1990. V. 19. № 6. P. 557–584.
17. *Zhang R., El-Mashad H.M., Hartman K., Wang F., Liu G., Choate C., Gamble P.* // Bioresour. Technol. 2007. V. 98. № 4. P. 929–935.
18. *Chen X., Romano R., Zhang R.* // Int. J. Agric. Biol. Eng. 2010. V. 3. № 4. P. 51–62.
19. *Stams A.J.M.* // Antonie van Leeuwenhoek. 1994. V. 66. P. 271–294.
20. *Заварзин Г.А.* // Микробиология. 1997. Т. 66. № 4. С. 669–673.
21. *Lynd L.R., Weimer P.J., van Zyl W.H., Pretorius I.S.* // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2002. V. 66. № 3. P. 506–577.
22. *O'Sullivan C.O., Burrell P.C., Clarke W.P.* // Biores. Technol. 2008. V. 99. № 11. P. 4723–4731.
23. *Dugba P.N., Zhang R.* // Biores. Technol. 1999. V. 68. № 3. P. 225–233.
24. *Sanchez E., Borja R., Weiland P., Travieso L., Martin A. E.* // Bioprocess Eng. 2000. V. 22. № 3. P. 247–252.
25. *Zabranska J., Stepova J., Wachtl R., Jenicek P., Dohanyos M.* // Water Sci. Technol. 2000. V. 42. № 9. P. 49–56.
26. *Ahn J.H., Forster C.F.* // Proc Biochem. 2000. V. 36. № 1–2. P. 19–23.
27. *Cheunbarn T., Pagilla K.R.* // J. Environ. Eng. 2000. V. 126. № 9. P. 796–801.
28. *Cabirol N., Rojas Oropeza M., Noyola A.* // Water Science Technol. 2002. V. 45. № 10. P. 269–274.
29. *Sahlström L.* // Biores. Technol. 2003. V. 87. № 2. P. 161–166.

Biogas Production by Microbial Communities via Decomposition of Cellulose and Food Waste

E. A. Tsavkelova, M. A. Egorova, E. V. Petrova, and A. I. Netrusov

Department of Biology, Moscow State University, Moscow, Russia

e-mail: tsavkelova@mail.ru

Received May 24, 2011

Abstract—Several active microbial communities that form biogas via decomposition of cellulose and domestic food waste were identified among 24 samples isolated from different natural and anthropogenic sources. The methane yield was 90–260 ml CH₄/g from microbial communities grown on cellulose substrates, office paper, and cardboard at 37°C without preprocessing. Under mesophilic conditions, bioconversion of paper waste yields biogas with a methane content from 47 to 63%; however, the rate of biogas production was 1.5–2.0 times lower than under thermophilic conditions. When microbial communities were grown on DFW under thermophilic conditions, the most stable and effective of them produced 230–353 ml CH₄/g, and the methane content in biogas was 54–58%. These results demonstrated the significance of our studies for the development of a technology for the biotransformation of paper waste into biogas and for the need of selection of microbial communities to improve the efficiency of the process.