

СТИМУЛИРОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ МЕТАНОГЕННОГО БРОЖЕНИЯ ЖИДКИХ ОРГАНИЧЕСКИХ ОТХОДОВ

**В.В. КОВАЛЕВ, В.Э. НЕННО, В.А. БОБЕЙКА, И.А. СЕНЬКОВСКАЯ,*
О.В. КОВАЛЕВА, Д.В. УНГУРЯНУ****

Научно-исследовательский центр прикладной и экологической химии Молдавского госуниверситета

**Институт почвоведения, агрохимии и защиты почвы им. Н.А. Димо*

***Технический университет Молдовы*

Se propune un concept nou tehnico-științific privind utilizarea deșeurilor de la producerea vinului și de la procesele de distilare. Sunt arătate rezultatele cercetărilor complexe privind efectul substanțelor biologic active asupra procesului de metanogeneză, microorganismelor și activitatea dehidrogenazică a deșeurilor industriale de distilare a vinului și alcoolului. S-a demonstrat că substanțele testate ridică de 3-4 ori eficacitatea fermentării, iar conținutul metanului în biogaz – de la 58-60% până la 90-95% – activează dehidrogenaza. Se discută efectul substanțelor biologic active asupra procesului de metanogeneză.

A new scientific-technological concept of the utilization of wastes wine and alcohol production is proposed. The results of complex research are given, related to the effect of biologically active substances on the process of methanogenesis, microorganisms and dehydrogenase activity of winery and alcohol industry wastes. It was shown that the test substances increase the efficiency of the fermentation by 3-4 times, the methane content in biogas from 58-60% to 90-95% and stimulate the dehydrogenase. The effect of biologically active substances on the process of methanogenesis is discussed.

Введение

Получение биогаза является важной частью общей концепции устойчивого развития, основанной на производстве высокоэнергетических топливных агентов – спиртов, масел, газов, прессованных брикетов из восстанавливаемого растительного сырья, с расчетом частичной замены и экономии невозобновляемых видов энергетических ресурсов – нефти, угля, природного газа.

Развитие технологий анаэробного сбраживания жидких и твердых отходов предприятий по переработке сельскохозяйственной продукции является одним из перспективных направлений в производстве биогаза из растительного сырья и органических отходов агропромышленного комплекса. Энергетическим материалом могут служить жидкие отходы винодельческого, спиртоперегонного, пивоваренного, дрожжевого и мясомолочного производств, твердые и жидкие отходы переработки различных видов зерновых культур, картофеля, сахарной свёклы, фруктов и овощей и др.

Биогaz – продукт анаэробного разложения органических веществ. Перечень органических субстратов, которые можно использовать для производства биогаза, является огромным по сравнению с перечнем тех, которые применяются в настоящее время. Установлено, что 86% биогазового потенциала содержится в сельскохозяйственном сырье и лишь 8% – в промышленных и коммунальных отходах [2, 4].

Подход, основанный на утилизации отходов с целью получения биогаза, имеет ряд неоспоримых преимуществ:

- существенное повышение степени переработки отходов сельскохозяйственного производства, более полная их утилизация;
- сокращение площадей сельскохозяйственных земель для выращивания растений, имеющих значение с точки зрения энергетики;
- значительное снижение содержания органических загрязнителей в сточных водах предприятий, уменьшение нагрузки на очистные сооружения и смягчение негативного техногенного воздействия на окружающую среду.

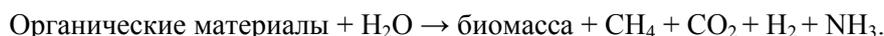
В настоящее время разработано и применяется достаточно большое количество технологий получения биогаза, основанных на использовании различных условий его производства: температурного режима, влажности, концентраций микробной биомассы, длительности протекания микробиологических процессов и так далее [9]. Однако существующие технологии и оборудование до сих пор не обеспечивали получение биогаза из отходов с максимально возможным выходом. Согласно техноло-

гическим параметрам, только 30-60% органических примесей в составе отходов подвергаются превращению в биогаз, а содержание метана в биогазе в большинстве случаев составляет не более 60-70%.

Решение проблемы повышения эффективности производства биогаза из отходов переработки сельскохозяйственной продукции должно быть основано на улучшении производственных параметров (снижения расходов, повышения КПД и др.), оборудования и технологических схем, а также на разработке и внедрении новых технологий с учетом экологической безопасности.

В биотехнологии получения биогаза из органических отходов *должны учитываться особенности метаногенеза*. Согласно современным представлениям, преобразование органических отходов в биогаз происходит в результате целого комплекса сложных биохимических превращений благодаря микроорганизмам [8, 11, 12] и в соответствии со схемой (рис. 1).

Суммарная реакция этого процесса может быть описана следующим образом:



Качество биогаза определяется в первую очередь содержанием метана. Двуокись углерода разбавляет биогаз и снижает его энергетические показатели. Кроме того, по балансовому расчету количество образующегося водорода является недостаточным для образования CH_4 . Поэтому актуальной является разработка биотехнологий по увеличению содержания метана в биогазе. Это может быть достигнуто селективной очисткой биогаза от сопутствующих газов (CO_2 , H_2S), оптимизацией технологии его получения путем ввода биологически активных соединений, способствующих развитию метаногенных бактерий.

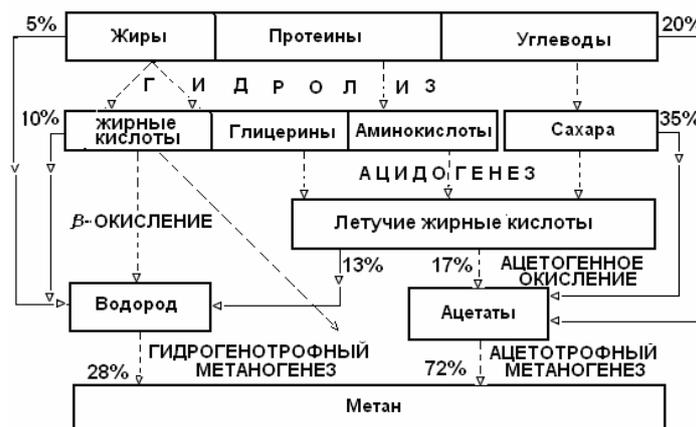


Рис.1. Пути метаболизма органических соединений при анаэробном брожении [4]

При введении биостимуляторов в биохимический процесс даже в незначительных количествах повышается скорость роста бактерий и интенсивность анаэробного сбраживания. Это приводит к снижению времени процесса, что, в свою очередь, может существенно снизить капитальные и эксплуатационные затраты. Получены хорошие результаты при использовании для этих целей «мелафена» – синтетического стимулятора развития растений, являющегося меламиновой солью бис(оксиметил)фосфиновой кислоты [1]. Для изучения процессов интенсификации метаногенеза нами выбрано направление по получению и испытанию в качестве биологически активных веществ (БАВ) природных изопреновых соединений с возрастающим количеством функциональных групп в молекуле.

Одним из путей совершенствования биохимической технологии для повышения выхода биометана является *разделение ацетогенного и метаногенного пространств в биореакторе*, с целью отделения выделяющегося CO_2 от других продуктов ацетогенной стадии процесса и его последующего смешивания в метаногенном пространстве с водородом.

Цель предпринятых исследований – интенсификация анаэробного сбраживания барды винного и спиртоперегонного производства при помощи природных биологически активных веществ для повышения выхода биогаза, содержания в нём метана и снижения энергоёмкости биохимического процесса.

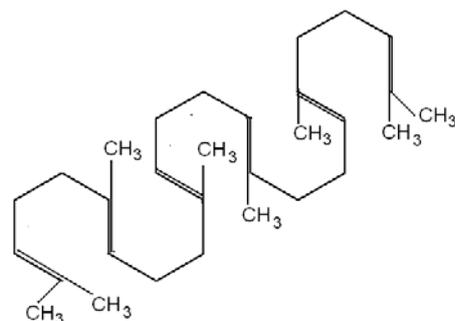
неизменным – рН в биореакторах поддерживался на уровне 7,4-7,6. Одновременно проводились замеры объема выделяемого газа и его состав. Одинаковые значения этого показателя в течение 5-7 суток свидетельствовали о завершении процесса выращивания микрофлоры в биореакторах.

Затем производилось постепенное замещение питательной смеси (порционно, на 25%) на барду спиртоперегонного завода «Бардар», образующуюся в результате перегонки виноматериалов на коньячный спирт. После каждого замещения выдерживалось время до получения стабильных показателей выхода газа. Один из биореакторов служил контролем. После проведения первой серии экспериментов биореакторы переводились на единую для всех питательную смесь, и после достижения стабильных показателей рН, объема и состава газа они были готовы к проведению следующей серии экспериментов.

Влияние БАВ на процесс метаногенеза оценивалось по изменению скорости выделения газа и содержания в нем метана. Измерения проводили с 10 до 54 ч с момента введения свежей барды. Показания снимали после 2-х циклов подкормки и последующих 3-х циклов подкормки. Общее время одного эксперимента составляло 300 часов.

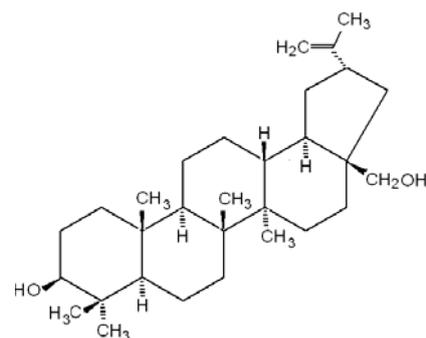
Биологически активные вещества. В качестве биологически активных веществ, которые, как предполагалось, будут стимулировать микробиологическую активность, ускорять процесс метаногенеза и повышать выход метана, испытывали *скавален* и *бетулинол* в различных концентрациях. БАВ отбирали с учетом их биологической активности, простоты синтеза или экстракционного выделения, а также доступности исходного сырья.

Скавален (2,6,10,15,19,23-гексаметилтетракоза-2,6,10,14,18,22-гексаен) получали из неомыляемой фракции масла амаранта при действии соляной кислоты путем его экстрагирования малополярными органическими растворителями – хлороформом, или ацетоном, или гексаном, или петролейным эфиром. Представляет собой углеводород тритерпенового ряда природного происхождения. Принадлежит к группе каротиноидов и содержится не только в составе семян амаранта, но и в семенах хлопка, льна и других. Содержание скавалена в семенах амаранта составляет 8-10%.



Бетулинол ($C_{30}H_{50}O_2$) – кристаллическое органическое вещество, содержащееся в берёзовом соке и дегте, заполняющее полости клеток пробковой ткани берёзовой коры, придавая белый цвет стволам березы. Он легко экстрагируется из бересты, содержащей тритерпеновые соединения, основным из которых является *бетулин*.

Бетулин не растворим в воде, но сравнительно хорошо растворяется в спирте. Обладает широким спектром биологического воздействия на микроорганизмы. Благодаря антиоксидантной, антигипоксантной и антимуtagenной активности, он стабилизирует клеточные мембраны микроорганизмов, повышает их устойчивость к повреждению в условиях недостатка кислорода и одновременно с этим препятствует перекисному окислению липидов.



Тестирование БАВ с целью проверки их возможного активирующего (ингибирующего) действия на микроорганизмы проводили в эксперименте с использованием питательной среды с добавлением их в концентрациях $10^{-2} \dots 10^{-5}$ %. Тест-объектом служили аэробные бактерии барды спиртоперегонного производства (СП), отобранной из контрольного биореактора. Тестирование амаранта и бетулинола в аспекте их влияния на дегидрогеназную активность барды осуществляли в дополнительном эксперименте, в анаэробных условиях. БАВ применяли в концентрации 0,033%.

Химические показатели. Предварительно оценивали рН, влажность, содержание сухого вещества, содержание общего углерода в исходной барде стандартными методами. Показатели химического и биологического потребления кислорода (ХПК и БПК₅) регистрировали по стандартной методике, объем газа – волюмометрическим методом, состав биогаза – хроматографическим методом.

Микробиологические и энзиматические показатели. Микробную биомассу (МБ) в осадке сточных вод определяли регидратационным методом. Численность микроорганизмов (в том числе аэробных

гетеротрофных) определяли методом посева на твердые питательные среды [3, 5]. Метанобразующие бактерии в исходной барде определяли по методике Хангейта. CO₂-продуцирующую способность осадка оценивали методом титрования. Активность дегидрогеназы определяли колориметрическим методом [5].

Результаты исследований и их обсуждение

Характеристика барды спиртоперегонного производства и осадка сточных вод. Барда СП представляет собой жидкую суспензию желтоватого цвета с влажностью 91,3-91,6%, с незначительным содержанием сухого вещества – 8,4-8,8% и кислой реакцией среды (pH=5,4). Содержание общего углерода составляло 4,25% от сырой и 49,5% от сухой массы отходов (табл.1). Отходы характеризуются высокими показателями ХПК и БПК₅ – 28250 и 17800 мгО₂/л соответственно. Исходная барда содержала аэробную гетеротрофную микрофлору (табл.1). После нейтрализации и подщелачивания, такая барда использовалась как среда для культивирования метанобразующих бактерий.

Таблица 1

Химический и микробиологический состав исходной барды СП

Отходы	pH	Влажность, %	Сухое вещество, %	C, % от сырой массы	C, % от сухой массы	ХПК, мгО ₂ /л	БПК ₅ , мгО ₂ /л	Гетеротрофные бактерии, КОЕ·10 ⁶ /мл
Барда СП	5,4	91,25-91,59	8,41-8,75	4,25	49,5	28250	17800	7,39

*в таблицах КОЕ – колониеобразующие единицы

Микробиологические исследования осадков сточных вод показали, что они являются материалом со слабощелочной реакцией (pH=7,5), обладают высоким содержанием органического вещества (в среднем 21,3%). Это обуславливает высокую численность бактерий, CO₂-продуцирующую способность отходов и их дегидрогеназную активность (табл.2).

Таблица 2

Микробиологическая и биохимическая характеристика осадков сточных вод

МБ	Гетеротрофные бактерии	Nocardia	Актиномицеты	Метанобразующие бактерии	Грибы	CO ₂	Дегидрогеназная активность
мг С /г	КОЕ·10 ⁶ / г			КОЕ·10 ³ / г		мг/100г/24 ч	мг ТФФ/ 10 г /24ч
2,5	1286,8	249,3	22,8	350	5,4	1,91	11,8

Установлено, что осадки сточных вод являются биологически активными материалами, в микробном сообществе которых преобладают бактерии. Численность грибов незначительна. Содержание микробного углерода составляет 2,5 мг С/г осадка. Одна тонна отходов содержит в среднем 5,0 кг сухой микробной биомассы. Осадок сточных вод содержит метанобразующие бактерии в количестве 350 · 10³ КОЕ/ г.

Оптимизация условий анаэробного процесса. Скорость выделения биогаза находится в зависимости от длительности процесса и вида питательной смеси (рис.3). На начальном этапе происходит адаптация микробного сообщества к новым источникам питания, затем наблюдается интенсивное выделение газа и подкисление питательной жидкости в результате ацетогенной фазы брожения. В условиях кислой реакции среды (pH = 3,8 -5,0) выделение биогаза практически полностью подавляется и возникает вновь только при достижении значений pH >7,0. Скорость продуцирования газа резко нарастает в течение 10-15 часов и отражает экспоненциальную фазу роста микроорганизмов. В течение последующих 10-30 часов (при подпитывании смесью сахар + молоко) и 15-50 часов (при подпитывании бардой

СП) регистрируется стабилизация этого показателя. В течение последующих 20 часов происходит снижение выделения газа: резкое – при подпитывании смесью сахар + молоко и плавное – при подпитывании бардой СП. График зависимости скорости выделения биогаза от времени брожения совпадает с классической кривой роста бактерий в периодической культуре [10]. Следует отметить, что выделение газа при использовании смеси сахар + молоко в десятки раз превышает таковое при переводе анаэробного микробного сообщества на подпитывание бардой СП. Это свидетельствует о том, что органическое вещество отходов является для анаэробов более сложным для разложения субстратом.

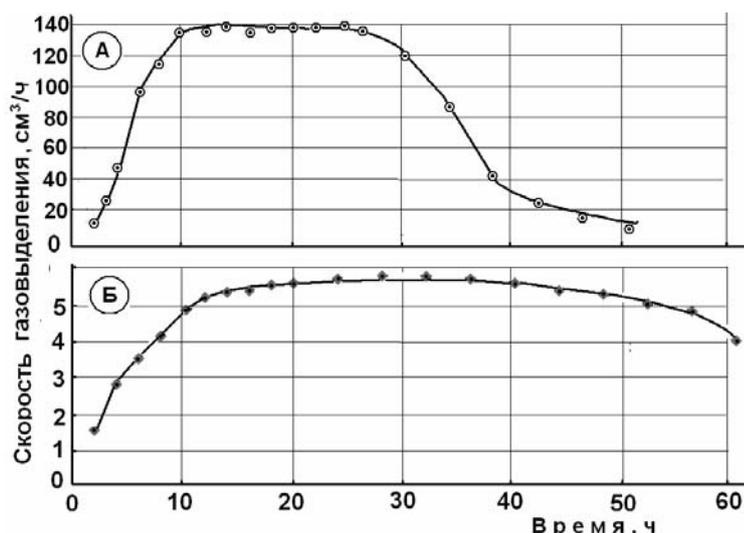


Рис.3. Изменение скорости выделения биогаза в зависимости от питательной смеси: А – смесь сахар+молоко; Б – барда спиртового производства

Влияние БАВ на процесс метаногенеза. Бетулин и сквален способствуют интенсификации процесса анаэробного сбраживания органического субстрата барды и как следствие – повышению общего выхода биогаза, а в ряде случаев – и содержания в нём метана. Экстракт амаранта (действующее вещество – сквален) в 3-4 раза повышает скорость выделения газа и производительность процесса метаногенеза. Использование бетулинола (действующее вещество – бетулин) не оказывает заметного влияния на скорость биохимического процесса, однако приводит к увеличению доли метана в составе биогаза с 65-70 % до 90-95%. В связи с этим представляло интерес изучить влияние смеси БАВ на метаногенный процесс. Применение добавок повышает в 2,5-3 раза скорость выделения биогаза (рис. 4, табл. 3). При этом содержание в нем метана увеличивается с 58-60% на контроле до 90-92% на вариантах с использованием смеси бетулинол + амарант. БАВ позволяют получать практически тот же объем биогаза, что и на контроле, только в 3,7 раза быстрее, при этом скорость выделения биогаза почти в 4 раза выше. Увеличение концентрации БАВ свыше 5,0 мг/л барды не сопровождается увеличением скорости продуцирования газа и усилением интенсивности метаногенеза, поэтому является нецелесообразным.

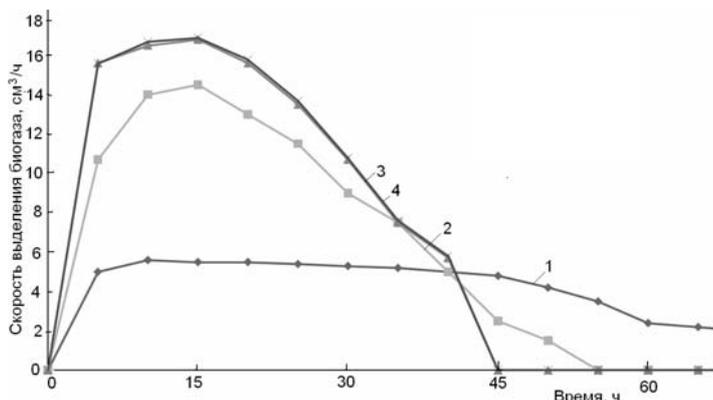


Рис.4. Скорость выделения биогаза в зависимости от концентрации БАВ (бетулинол + амарант в соотношении 1:1):
 1 – контроль;
 2 – 2,5 мг/л;
 3 – 5,0 мг/л;
 4 – 10,0 мг/л.

Таблица 3

Влияние смеси бетулинола и амаранта на объём и скорость выделения биогаза

Время, ч		Контроль		Концентрация добавок смеси бетулинола и амаранта в их соотношении 1 : 1, в вес. %					
				$2,5 \cdot 10^{-4}$		$5,0 \cdot 10^{-4}$		$1,0 \cdot 10^{-3}$	
с начала		объём, мл	скорость, мл/ч	объём, мл	скорость, мл/ч	объём, мл	скорость, мл/ч	объём, мл	скорость, мл/ч
0-18	18	90	5,6	250	13,9	325	19,1	300	16,7
19-25	7	40	5,5	75	10,7	75	10,7	100	14,3
26-45	20	100	5,5	50	2,5	0	0	0	0
46-69	24	110	5,0	0	0	0	0	0	0
70-93	24	75	3,1	0	0	0	0	0	0
ИТОГО		415	4,8	375	8,3	400	16,0	400	16,0

Необходимо отметить, что использование смеси бетулинол + амарант не только сокращает лаг-фазу и активизирует быстрый рост микробного сообщества в биореакторах, но и существенно укорачивает стационарную фазу его развития. Это способствует ускорению протекания биохимических метаногенных процессов, повышению выхода биогаза и позволяет быстрее утилизировать отходы.

С практической точки зрения это обуславливает возможность сокращения капитальных и эксплуатационных расходов на строительство биореакторов и очистных сооружений в целом.

Влияние БАВ на микроорганизмы и дегидрогеназную активность. Известно, что на метанобразующие микроорганизмы стимулирующее влияние оказывают биомасса и экстракты различных видов растений – лаванды, золотарника, тысячелистника, ипомеи, амаранта [12, 13]. Предполагается, что БАВ способствуют интенсификация процесса анаэробного брожения органического субстрата благодаря их антиоксидантной, антигипоксантажной и антимутагенной биохимической активности. БАВ стабилизируют клеточные мембраны микроорганизмов, снижают перекисное окисление липидов и препятствуют повреждению клеточных мембран. Немаловажное значение имеет и тот факт, что белок листьев амаранта по своему аминокислотному составу близок к идеальному и обладает высокой пищевой ценностью. В литературе обсуждаются перспективы приготовления на основе амаранта питательных сред для выращивания микроорганизмов.



Рис.5. Стимулирование роста гетеротрофных аэробных бактерий в эксперименте с лабораторными биореакторами: 1 – контроль; 2 – амарант 0,0005%; 3 – бетулинол 0,0005%

Установлено, что амарант и бетулинол стимулируют в 2,2-2,4 раза рост и размножение гетеротрофных аэробных бактерий (рис. 5), что может активировать аэробную фазу переработки отходов и улучшить их подготовку к процессу метаногенеза. Эти результаты косвенно свидетельствуют о существовании механизма биологически активного действия этих веществ на микроорганизмы.

Механизм энергетических процессов метаногенов еще не расшифрован, но общие принципиальные положения установлены. Получение энергии, по крайней мере при окислении H_2 , сопряженном с восстановлением CO_2 , связано с функционированием электрон-транспортной системы, включающей дегидрогеназы, переносчиков электронов и редуктазы. В качестве дегидрогеназ идентифицированы гидрогеназа и формиатдегидрогеназа.

Тестирование 2-х видов БАВ продемонстрировало стимулирующее влияние амаранта и бетулинола в концентрации 0,033% на активность дегидрогеназы (рис. 6).

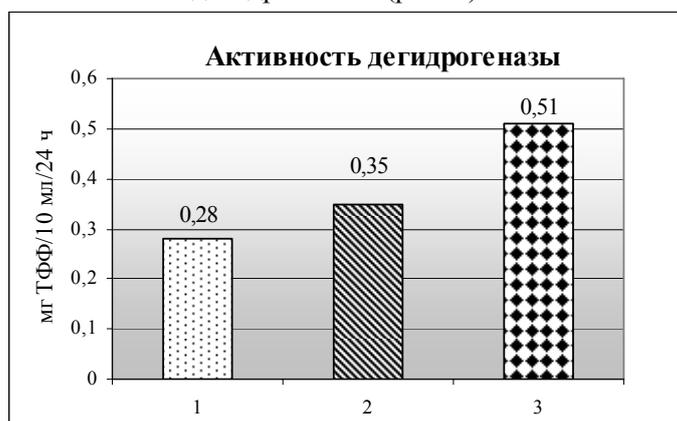


Рис.6. Влияние БАВ на активность дегидрогеназы в барде СП:
1 – контроль; 2 – амарант 0,033%; 3 – бетулинол 0,033%

Амарант активировал дегидрогеназы на 25%, бетулинол – в 1,8 раза. Эти БАВ признаны перспективными для их использования в качестве стимуляторов метаногенного процесса. Дальнейшие исследования предполагается проводить с расширением номенклатуры БАВ и разработкой оптимальных условий их применения.

Выводы

1. Решение проблемы утилизации жидких отходов винодельческой и спиртоперегонной промышленности возможно на основе разработки экологически обоснованных технологий их анаэробного сбраживания. Повышение эффективности производства биогаза с увеличенным содержанием в нем биометана из растительного сырья и отходов переработки сельскохозяйственной продукции может быть осуществлено посредством использования различных биологически активных веществ природного происхождения.

2. Барда спиртоперегонного производства представляет собой жидкую суспензию с влажностью 91,3-91,6%, незначительным содержанием сухого вещества – 8,4-8,8%, и с кислой реакцией среды (рН=5,4). Содержание общего углерода составляет 4,25% от сырой и 49,5% от сухой массы отходов. Отходы характеризуются высокими показателями ХПК и БПК₅ – 28250 и 17800 мгО₂/л соответственно. Барда содержит аэробную гетеротрофную микрофлору. После нейтрализации и подщелачивания она может быть использована как среда для культивирования метанобразующих бактерий.

3. Технология анаэробного сбраживания барды основана на нейтрализации кислой реакции среды отходов до рН=7,0-7,2 и использовании биологически активных веществ в качестве добавок, стимулирующих процесс метаногенеза.

4. Использование бетулинола и экстракта амаранта в их соотношении 1 : 1 и концентрации $5,0 \cdot 10^{-4} \dots 1,0 \cdot 10^{-3}$ вес. % является эффективным способом ускорения биохимических метаногенных процессов. Эти вещества повышают активность дегидрогеназы, сокращают лаг-фазу, активируют экспоненциальный рост микробного сообщества и существенно укорачивают стационарную фазу его развития. Применение смеси бетулинола и экстракта амаранта повышает выход биогаза в 2,5-3 раза, увеличивает содержание в нем метана с 58-60% до 90-92%, что позволяет более эффективно и быстро утилизировать отходы.

5. Бетулинол и экстракт амаранта обладают способностью стимулировать рост аэробных гетеротрофных бактерий, что может быть использовано в аэробной стадии утилизации жидких отходов

винодельческого и спиртоперегонного производства и для улучшения их подготовки к анаэробной стадии. Механизм биологического действия добавок на процесс метаногенеза и в целом на микроорганизмы обсуждается.

Литература:

1. Барский Е. Л., Шандиева И. О., Саванина Я. В. и др. Эффект мелафена на развитие культур цианобактерий и зеленых микроводорослей в стрессовых условиях // Вестник Московского государственного университета, 2011, №1, с.15-20.
2. Добрынина О.М., Калинина Е.В. Технологические аспекты получения биогаза // Вестник Пермского государственного технического университета: Охрана окружающей среды, транспорт, безопасность жизнедеятельности, 2010, №2, с.33-40.
3. Йожеф Сэги. Методы почвенной микробиологии. - Москва: Колос, 1983. - 295 с.
4. Корзникова М.В., Блохин А.Ю., Козлов Ю.П. Оценка степени конверсии органического вещества отходов животноводства и птицеводства в биогаз (на примере РФ) // Вестник ВГУ. Серия: химия, биология, фармация, 2008, №2, с.108-111.
5. Методы почвенной микробиологии и биохимии / Под ред. Д.Г.Звягинцева. - Москва: МГУ, 1991. - 224 с.
6. Миндубаев А.З., Минзанова С.Т., Скворцов Е.В. и др. Влияние фитомассы амаранта на кинетику метанового брожения // Материалы II Международной научно-практической конференции «Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии» 15-16 сентября 2008 г. - Казань, 2008, с.85.
7. Миндубаев А.З., Минзанова С.Т., Скворцов Е.В. и др. Стимулирующее влияние сухой фитомассы амаранта *Amaranthus spuentus* на биометаногенез в трудноферментируемых субстратах. Тезисы докладов V Всероссийской научной конференции «Химия и технология растительных веществ», 2008, с. 206.
8. Хаммер М. Технология обработки природных и сточных вод / Перевод с англ., под ред. Т.А.Карюхиной. - Москва, 1979. - 400 с.
9. Шеина О.А., Сысоев В.А. Биохимия процесса производства биогаза как альтернативного источника энергии // Вестник ТГУ, 2009, т.14, вып.1, с.73-76.
10. Шлегель Г. Общая микробиология / Пер. с нем. - Москва: Мир, 1987, с.194-197.
11. Яковлев С.В., Карюхина Т.А. Биохимические процессы в очистке сточных вод. - Москва, 1980. - 200 с.
12. Barker H.A. Biological formation of methane // Bacterial fermentations. - N.Y., 1956, p.1-95.
13. Covaliov V., Covaliova O., Ungureanu D. Procedeu de obținerea a încărcăturii volumice pentru fixarea microflorei și reactor anaerob cu utilizarea acestuia pentru epurarea biochimică a apelor uzate. Brevet de invenție Nr. 187Y. Publ. BOPI, 2010, nr.4.

Prezentat la 07.03.2012