

УДК 579.64; 631.147:631.46

**ИЗУЧЕНИЕ МЕТОДОВ ВЫДЕЛЕНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ  
МИКРООРГАНИЗМОВ ТОРФЯНОЙ БИОСИСТЕМЫ ДЛЯ ОПТИМИЗАЦИИ  
ГИДРОЛИЗА ЛИГНОЦЕЛЛЮЛОЗНОГО СЫРЬЯ**

**STUDY OF THE METHODS OF EXTRACTION AND IDENTIFICATION OF PEAT  
MICROORGANISMS FOR OPTIMIZATION OF LIGNOCELLULOSE HYDROLYSIS**

©**Лакина Н. В.**

канд. хим. наук

*Тверской государственной технической университет*

*г. Тверь, Россия, lakina@yandex.ru*

©**Lakina N.**

*Ph.D., Tver State Technical University*

*Tver, Russia, lakina@yandex.ru*

©**Петрова А. И.**

*Тверской государственной технической университет*

*г. Тверь, Россия, alenkapet08@rambler.ru*

©**Petrova A.**

*Tver State Technical University*

*Tver, Russia, alenkapet08@rambler.ru*

©**Долуда В. Ю.**

канд. хим. наук

*Тверской государственной технической университет*

*г. Тверь, Россия, doludav@yandex.ru*

©**Doluda V.**

*Ph.D., Tver State Technical University*

*Tver, Russia, doludav@yandex.ru*

©**Сулман Э. М.**

д-р хим. наук

*Тверской государственной технической университет*

*г. Тверь, Россия, sulman@online.tver.ru*

©**Sulman E.**

*Dr. habil., Tver State Technical University*

*Tver, Russia, sulman@online.tver.ru*

*Аннотация.* На сегодняшний день актуальным направлением исследований является производство биотоплива из возобновляемого сырья. По сравнению с ископаемым видом топлива этанол, полученный из растений, климатически нейтрален и не способствует антропогенному парниковому эффекту. В Тверском регионе сырьем для получения биоэтанола является торф. Торфяные гидролизаты содержат широкий спектр сахаров, которые возможно использовать в различных отраслях промышленности. В работе были исследованы и идентифицированы микроорганизмы, обнаруженные в торфяных почвах. Были использованы методы посева и микроскопирования для получения конкретных сведений о родах почвенных микроорганизмах. В ходе работы были выделены почвенные микроорганизмы из торфа, а именно микромицеты рода *Penicillium* и *Trichoderma*, а также актиномицеты рода *Actinomyces* и бактерии рода *Bacillus*. Гидролитическая деструкция полученной культуральной жидкости была дополнительно изучена под влиянием

гидромодуля. Количественный анализ реакционной массы проводился методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

*Abstract.* Nowadays, the production of biofuel from renewable raw materials is the topical research field. As compared to fossil fuels, ethanol derived from plants is climate neutral and does not contribute to anthropogenic greenhouse effect. In the Tver region, peat is one of the raw materials that can be used for bioethanol production. Peat hydrolysates contain a wide range of sugars, which can be used in various industries. In this work, microorganisms found in peat soils were investigated and identified. Methods of sowing and microscopy were used to obtain specific information on the genus of soil microorganisms. During the work, soil microorganisms were isolated from peat, namely micromycetes of the genus *Penicillium* and *Trichoderma* and actinomycetes of the genus *Actinomyces* and bacteria of the genus *Bacillus*. The hydrolytic destruction of the resulting culture liquid was further studied under the influence of the hydromodule. Quantitative analysis of the reaction mass was carried out by high-performance liquid chromatography.

*Ключевые слова:* биоэтанол, торф, микроорганизмы, биотрансформация, глюкоза.

*Keywords:* bioethanol, peat, microorganisms, biotransformation, glucose.

Учитывая растущие цены на нефть и будущий ее дефицит, а также зависимость от нефтедобывающих крупных регионов и прежде всего от вредных климатических выбросов диоксида углерода в результате сжигания обычного топлива стало необходимым осваивать новые регенеративные источники энергии. Одним из таких альтернативных видов топлива, которое в последние годы приобрело значение, является биоэтанол [1]. Биоэтанол, получаемый из возобновляемого сырья, можно смешивать с бензином и можно сжигать в обычных бензиновых двигателях с долей до 20%. Это так называемые автомобили с гибким выбором топлива, которые имеют модифицированный двигатель и могут работать с содержанием этанола до 95%, но и использовать обычный бензин.

Так как биоэтанол - это стопроцентное биогенное топливо, то круговорот диоксида углерода можно считать замкнутым. При сгорании биоэтанола образуется столько же диоксида углерода, сколько было связано во время роста растительным сырьем с помощью фотосинтеза. По сравнению с ископаемым видом топлива этанол, полученный из растений, климатически нейтрален и не способствует антропогенному парниковому эффекту [2].

В качестве субстрата для производства биотоплива в Тверской области принимаются во внимание различные виды сырья, которыми богат Тверской регион, а именно древесина и ее отходы переработки, а также большие залежи торфа.

На сегодняшний день перспективным направлением в использовании залежей торфа является получение из гидролизата торфа биоэтанола [3].

Микроорганизмы, живущие в почве, трансформируют растительные остатки, участвуют в формировании структуры почвы, образовании гумуса и его минерализации.

Основным геохимическим циклом почвы является обращение углерода, составляющими которого являются синтез фототрофных организмов органического вещества из углекислого газа и ее трансформация в простые соединения. Под влиянием внесения растительных остатков в почву наблюдается всплеск количества различных групп микроорганизмов и повышения их биохимической активности. Наиболее распространенным углеродсодержащим соединением в природе является целлюлоза [4].

Углеводный комплекс торфа содержит водорастворимые и легкогидролизуемые вещества в количестве от 6.9% до 63%. В них входят различные классы органических соединений (пентозы, уроновые кислоты, гексозы). Целлюлоза торфа относится к трудногидролизуемым веществам, ее содержание изменяется от 0.2% до 20%.

В естественных условиях трансформация целлюлозы осуществляется при участии групп микроорганизмов. Значительная роль в этом процессе принадлежит грибам, в том числе сапротрофным представителям родов *Trichoderma*, *Chaetomium*, *Dicoccum*, *Stachybotrys*, *Penicillium* и *Aspergillus*. Под воздействием грибов в торфе увеличивается содержание белковых веществ. Частичное разложение торфа дереворазрушающими грибами способствует обогащению его и легкогидролизуемым соединениями (<https://goo.gl/iGj5Lb>).

В гидролизатах торфа обнаружен широкий спектр сахаров, аминокислот, карбоновых, урновых кислот, гуминовых веществ и других соединений, способных активизировать или ингибировать разнообразные биологические процессы. Конечными продуктами являются осаждаемый торф, кормовая меласса, белковые кормовые дрожжи.

#### *Материал и методика*

В работе использовался торф, полученный из торфяных залежей Тверской области. Торф, просушен до влажности менее 6%, подвергнут предварительному измельчению и просеиванию до размеров менее 1 мм. Далее предобработанный торф, а именно его гидролизат, использовался в качестве субстрата для культивирования почвенных микроорганизмов, их идентификации, а также дальнейшей переработки культуральной жидкости с целью изучения влияния микроорганизмов на углеводную составляющую торфа и ее деструкцию.

Химический состав использованного торфа определялся по гравиметрической методике, основанной на последовательном удалении из биомассы экстрактивных веществ, гемицеллюлоз и лигнина.

Среди методов количественного анализа торфа на наличие микроорганизмов наиболее объективным является метод прямого микроскопирования. При этом способе готовилась почвенная суспензия, и в определенном объеме ее с помощью микроскопа подсчитывалось общее число микроорганизмов. Последующим пересчетом можно установить, сколько микроорганизмов приходится на 1 г исследуемой почвы. Таким методом было установлено, что в данном образце находятся палочковидные бактерии, обрывки мицелия грибов и актиномицетов.

При посеве почвенной суспензии на поверхность плотных сред на чашках Петри получают изолированные друг от друга колонии микроорганизмов. Для получения чистой культуры материал, взятый петлей из отдельной колонии, переносят в свежую питательную среду и равномерно распределяют шпателем по поверхности.

Путем отсева из этих колоний получают чистые культуры. Чистоту выделенной культуры проверяют следующим методом: рассеивают культуру истончающимся штрихом на поверхность плотной среды, следят за характером и однородностью роста колоний, контролируют микроскопически.

Засеянные почвенной суспензией чашки просматривают, начиная с 3-5 сут. Окончательный учет производят через 3-4 недели [5].

Диагностика и идентификация грибов проводятся на основании строения и способов формирования репродуктивных органов, имеют значение морфологические и культуральные признаки.

Морфологию бактериальных клеток изучают в препаратах «раздавленная капля», микроскопируя их при большом увеличении с иммерсионным объективом (x90) или по Грамму.

Для детальных исследований аскомицетов получают их выращивают на предметных или покровных стеклах. Используют метод «желобка».

Диагностика и идентификация бактерий и актиномицетов проводится на основании культуральных, морфологических, физиологических и хемотаксономических признаков с использованием Определителя бактерий Берджи [6].

Гидролитическая деструкция полученной культуральной жидкости была дополнительно изучена под влиянием гидромодуля и подвергнута термолизу при 120 °С в реакторе Parr Instruments 4848 (США), с общим объемом колбы 300 см<sup>3</sup> и максимальным рабочим давлением 200 атм. Перемешивание производилось роторной четырехлопастной мешалкой, приводимой в движение электродвигателем (максимальное число оборотов в минуту — 700). Контроль давления производится при помощи манометра. Термостатирование реактора осуществляется нагревательным блоком с программируемым контроллером. Точность поддержания температуры составляет 0,1°С.

Количественный анализ реакционной массы проводился методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. В ходе анализа была использована хроматографическая система «Хроматэк-Кристалл», снабженная вакуумным дегазатором, изократическим насосом, термостатом колонок и рефрактометрическим детектором. В качестве подвижной фазы использовались вода, подкисленная серной кислотой. Скорость подачи элюента 0.5 мл/мин. Определение концентрации сахаров проводилось по стандартным веществам и соответствующим калибровочным зависимостям.

### *Результаты и их обсуждение*

В ходе работы были выделены почвенные микроорганизмы из торфа, а именно микромицеты рода *Penicillium* и *Trichoderma*, а также актиномицеты рода *Actinomyces* и бактерии рода *Bacillus*.

Наиболее благоприятная температура для активной биотрансформации торфа колебалась от 20 до 40 °С. При этом более чувствительным к изменению температуры культивирования оказался гриб рода *Penicillium*. Изменение температуры сказывалось и на усвоении грибами целлюлозы. Если гриб рода *Trichoderma* более интенсивно расщеплял субстрат при повышении температуры, то более активная деградация органического вещества грибом рода *Penicillium* наблюдалась при 25–30 °С.

Суммарная целлюлазная активность проявлялась уже на 4-5-е сутки. По мере роста грибов уровень активности целлюлазы повышался.

В первые сутки культивирования идет интенсивный рост грибов, а активное разрушение органического вещества субстрата в более поздние сроки (15–22-е сутки) делают возможность предполагать, что накопление биомассы грибов в начале культивирования идет в основном за счет питательных веществ торфа, а именно гемицеллюлозного компонента.

Для оптимизации выхода сахаров было исследовано влияние гидромодуля на качество торфяного субстрата. Для исследования влияния гидромодуля на выход сахаров из гидролизата торфа (Рисунок) была проведена серия опытов с культуральной жидкостью, полученной на основе торфа, при варьировании количества воды от 50 до 250 мл.

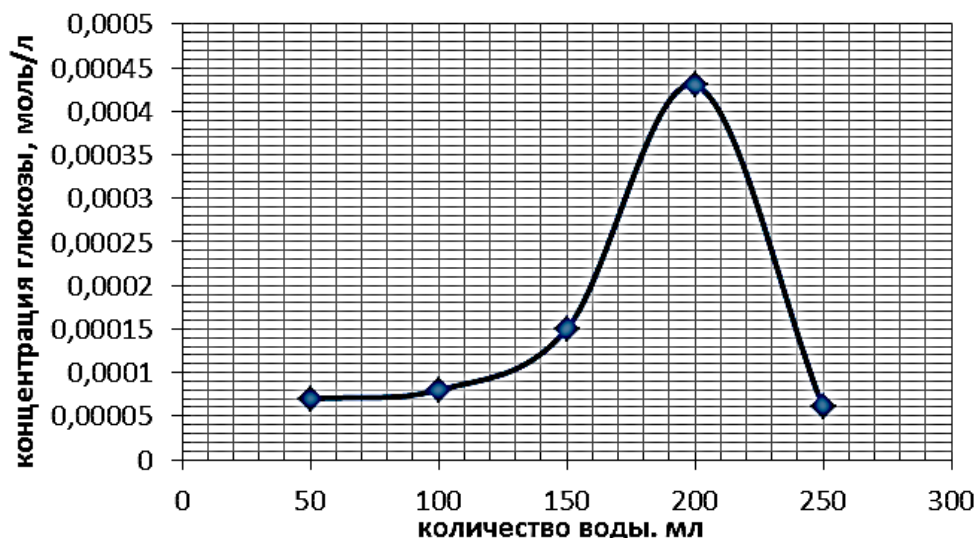


Рисунок. Влияние гидромодуля на концентрацию глюкозы в гидролизате торфа

Было установлено, что увеличение гидромодуля приводит к увеличению скорости гидролиза, однако при этом максимальный выход сахаров 10–15 масс. % наблюдается при 150 мл воды, что можно объяснить деструкцией глюкозы при большем гидромодуле и недостаточной конверсии торфа при более малом количестве воды.

#### Выводы

Таким образом, торфяно-болотные почвы играют роль среды, подходящей для развития микроорганизмов разнообразных таксономических и физиологических групп. Тем не менее численность, качественный состав и активность микрофлоры значительно зависят от свойств почв и экологических условий.

Ряд выделенных микроорганизмов способны с помощью ферментов разрушать субстрат до сахаров, которые возможно использовать в качестве исходного сырья для производства биоэтанола.

Поэтому исследования по изучению способов обработки лигноцеллюлозного сырья, а именно торфа, способствует оптимизации условий получения сахаров из возобновляемого сырья.

*Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №16-08-00158.*

#### Список литературы:

1. Balat M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: a review // Energy Convers. 2011. С. 858-875.
2. Karimi K., Shafiei M., Kumar R. Progress in physical and chemical pretreatment of lignocellulosic biomass. Berlin, Heidelberg: Biofuel technologies. Springer, 2013. С. 53-96.
3. Popper L. Integriertes Verfahren zur Gewinnung von Bioethanol aus nachwachsenden Rohstoffen: Verwertung von Roggenganzpflanzen durch innovativen thermischenzymatischen Aufschluss bei gleichzeitiger Biokonversion zu Ethanol und vollständiger Nutzung des Ligninanteils. Bioethanol // Abschlussbericht. 2009. März. S. 1-64.
4. Добровольская Т. Г. Бактериальные комплексы верхового торфяника в условиях различного микрорельефа // Почвоведение. 2017. №4. С. 483-489.

5. Куличевская И. С. Анализ филогенетического состава бактериальных сообществ малых лесных озер и верховых болот на водосборах Верхней Волги // *Микробиология*. 2011. Т. 80. №4. С. 543-551.

6. Полянская Л. М. Развитие микроорганизмов в аэробных и анаэробных условиях в черноземе // *Почвоведение*. 2010. №3. С. 356-360.

*References:*

1. Balat, M. (2011). Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: a review. *Energy Convers*, 858-875

2. Karimi, K., Shafiei, M., & Kumar, R. (2013). Progress in physical and chemical pretreatment of lignocellulosic biomass. Berlin, Heidelberg: Biofuel technologies. Springer, 53-96

3. Popper, L. (2009). Integriertes Verfahren zur Gewinnung von Bioethanol aus nachwachsenden Rohstoffen: Verwertung von Roggenganzpflanzen durch innovativen thermisch-enzymatischen Aufschluss bei gleichzeitiger Biokonversion zu Ethanol und vollständiger Nutzung des Ligninanteils. *Bioethanol. Abschlussbericht*, März. 1-64

4. Dobrovolskaya, T. G. (2017). Bakterialnye kompleksy verkhovogo torfyanika v usloviyakh razlichnogo mikrorel'efa. *Pochvovedenie*, (4), 483-489

5. Kulichevskaya, I. S. (2011). Analiz filogeneticheskogo sostava bakterialnykh soobshchestv malykh lesnykh ozer i verkhovykh bolot na vodosborakh Verkhnei Volgi. *Mikrobiologiya*, 80, (4), 543-551

6. Polyanskaya, L. M. (2010). Razvitie mikroorganizmov v aerobnykh i anaerobnykh usloviyakh v chernozeme. *Pochvovedenie*, (3), 356-360

*Работа поступила  
в редакцию 22.07.2017 г.*

*Принята к публикации  
26.07.2017 г.*

---

*Ссылка для цитирования:*

Лакина Н. В., Петрова А. И., Долуда В. Ю., Сульман Э. М. Изучение методов выделения и идентификации микроорганизмов торфяной биосистемы для оптимизации гидролиза лигноцеллюлозного сырья // *Бюллетень науки и практики. Электрон. журн.* 2017. №8 (21). С. 64-69. Режим доступа: <http://www.bulletennauki.com/lakina> (дата обращения 15.08.2017).

*Cite as (APA):*

Lakina, N., Petrova, A., Doluda, V., & Sulman, E. (2017). Study of the methods of extraction and identification of peat microorganisms for optimization of lignocellulose hydrolysis. *Bulletin of Science and Practice*, (8), 64-69