

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
**«БЕЛГОРОДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ  
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**  
( **Н И У « Б е л Г У »** )

ИНСТИТУТ ИНЖЕНЕРНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ И ЕСТЕСТВЕННЫХ НАУК

**Кафедра биотехнологии и микробиологии**

**ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ МИКРОФЛОРЫ СЫРЬЯ (СИЛОС)  
ПРИ ПРОИЗВОДСТВЕ БИОГАЗА**

**Магистерская диссертация**

Студента очной формы обучения  
направления подготовки 06.04.01 Биология  
магистерская программа Микробиология  
2 курса магистратуры группы 07001643  
Меньшикова Никиты Олеговича

**Научный руководитель**

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

**Рецензент**

доктор медицинских наук,  
заведующий кафедрой  
микробиологии медицинского  
института НИУ «БелГУ»,  
профессор Землянский О.А.

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА I ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	7
1.1.Понятие биогаз.....	7
1.2.Первые исследования биогаза.....	7
1.3.Преимущества биогаза.....	10
1.4.Виды сырья для производства биогаза.....	12
1.5.Основные характеристики сырья для производства биогаза.....	16
1.6.Этапы производства.....	17
1.6.1.Подготовка сырья.....	17
1.6.2.Подача субстрата.....	18
1.6.3.Период брожения.....	18
1.6.4.Перемешивание.....	18
1.6.5.Стабилизация процесса.....	18
1.7.Процесс образования биогаза.....	19
1.7.1.Этапы процесса.....	19
1.7.2.Типы ферментации.....	20
1.8.Фазы производства биогаза.....	21
1.8.1.Гидролизная фаза.....	21
1.8.2.Ферментация.....	22
1.8.3.Анаэробное окисление.....	23
1.8.4.Метаногенез.....	24
1.9.Содержание метана в биогазе.....	25
1.9.1. Процесс выделения газа .....	25
1.9.2.Состав питательных веществ субстрата.....	25
1.9.3.Температура субстрата.....	25

1.10.Метан и биоудобрения.....	26
1.11.Методы исследования активности микрофлоры сырья.....	27
1.11.1.Определение сахаролитической активности.....	28
1.11.2.Определение каталазной активности.....	28
1.11.3.Тест Фагеса-Проскауэра.....	29
1.11.4.Определение протеолитической активности.....	30
ГЛАВА II МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	31
2.1.Объект исследования.....	31
2.2.Отбор проб.....	32
2.3.Анализ микрофлоры силоса методом разбавления.....	32
2.3.1.Приготовление питательных сред.....	32
2.3.2.Приготовление разбавлений.....	33
2.3.3.Расчёт колоний микроорганизмов.....	35
2.4.Методы приготовления микроскопических препаратов.....	36
2.4.1.Метод раздавленной капли.....	36
2.4.2.Фиксированный препарат.....	36
2.4.3.Метод окраски по Граму.....	37
2.4.4.Метод обнаружения капсул у бактериальных клеток.....	37
2.5.Методы определения активности микроорганизмов.....	38
2.5.1.Метод определения протеолитической активности.....	38
2.5.2.Метод определения каталазной активности.....	39
2.5.3.Метод определения сахаролитической активности.....	39
2.6.Метод статистической обработки цифровых данных.....	40
2.7. Обработка цифровых данных методом дисперсионного анализа.....	42
ГЛАВА III РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	44
3.1.Анализ микрофлоры сырья «Силос» при производстве биогаза.....	44
3.2.Определение видовой принадлежности микрофлоры исследуемого сырья .....	46

3.3. Статистическая обработка цифровых данных.....	50
3.3.1. Обработка цифровых данных разностным методом.....	52
3.4. Обработка данных полученных в ходе проведения ферментативной активности микроорганизмов.....	57
3.4.1. Результаты проведения сахаролитической активности.....	57
3.4.2. Результаты проведения протеолитической активности.....	59
3.4.3. Результаты проведения каталазной активности.....	65
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	68
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	70

## ВВЕДЕНИЕ

В мире есть много источников энергии где используются исчерпаемые ресурсы такие как уголь, нефть, газ. При современном темпе использования этих источников наблюдается безвозвратная потеря уже через 50-70 появится проблема недостатка нефти, через 90 – газа, а угля в течении нескольких столетий. Для предотвращения этой проблемы придумали и начали задействовать альтернативные источники энергии, одним из которых является биогаз[15].

Увеличение количества выбросов парниковых газов, истощение земель и постоянное увеличение потребления воды заставляют искать новые источники энергии. Ограниченное количество ресурсов заставляет человечество переходить на безотходное производство. И биогазовая установка, на данный момент, является одним из элементов современного, безотходного производства, которые внедряются во многих областях сельского хозяйства и пищевой промышленности. Для многих предприятий, использование и получение биогаза позволяет решить не только энергетическую проблему, но также экологическую и экономическую[19].

Решение данной проблемы актуально на сегодняшний день, так как процесс переработки органических отходов имеет большую практическую ценность, как для экономики, так и для научного процесса в целом.

В связи с вышесказанным нами была выбрана следующая цель: определение активности, а также морфологических признаков микрофлоры сырья (силос) при производстве биогаза[9,22].

Для достижения данной цели были сформулированы следующие задачи:

- Проведение пробоотбора и осуществление посева микроорганизмов;
- количественное определение микрофлоры;

- определение обнаруженных микроорганизмов с точностью до вида;
- определение ферментативной активности обнаруженных видов микроорганизмов, населяющих субстрат.

Объектом исследования является сырьё «Силос» взяты на биогазовой станции Лучки в Прохоровском районе Белгородской области.

В качестве предмета исследования взята активность микрофлоры сырья «Силос» при производстве биогаза.

Магистерская диссертация изложена на 77 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы по теме исследования, характеристики объекта и методов исследования, результатов исследования, выводов, списка используемой литературы и приложений. Список использованных источников состоит из 57 отечественных источников и 16 иностранных. В работу включены 14 рисунков, 19 таблиц.

## 1.1 Понятие Биогаза

Биогаз - это экологически чистое топливо, во многом сходное по своим характеристикам с природным газом. Общее название газовой смеси, получаемой при разложении органических субстанций в результате анаэробного (безкислородного) микробиологического процесса (метанового брожения). Для эффективного производства биогаза из органического сырья создаются комфортные для жизнедеятельности нескольких видов бактерий условия в полном отсутствии доступа к кислороду. В состав этого газа входят метан ( $\text{CH}_4$ ) углекислый газ ( $\text{CO}_2$ ), малое количество сероводорода ( $\text{H}_2\text{S}$ ), водород ( $\text{H}_2$ ) и аммиак ( $\text{NH}_3$ ). Состав биогаза может меняться в зависимости от вида органического сырья, которое используется для его производства, Так как биогаз на 70% состоит из метана – горючего газа, что составляет основу природного газа, его энергетическая ценность (удельная теплота сгорания) составляет 60-70% энергетической ценности природного газа [11].

Смесь веществ, которую загружают в биореактор для перерабатывания бактериями, называется биосубстрат. Биосубстрат чаще всего состоит из смеси навоза и измельченного кукурузного силоса [5].

## 1.2. Первые исследования биогаза

В XVII столетии Ян Батист Ван Гельмон обнаружил, что разлагающая

биомасса выделяет воспламеняющиеся газы. В 1776 году Алессандро Вольта пришёл к выводу о том что существует зависимость между количеством выделяемого газа и разлагающиеся биомассы. Метан в биогазе был обнаружен уже в 1808 году сэром Хэмфри Дэвидом. А уже самые первые установки для получения биогаза появились в странах с тёплым климатом. Самая первая биогазовая установка была построена в 1859-м году в Бомбее, Индия. А в 1895 году биогаз применялся в Великобритании для уличного освещения. Первый настоящий завод по производству биогаза был построен в 1911 году в английском городе Бирмингеме. Его задачей было обеззараживания осадка сточных вод города, а вырабатываемый им биогаз использовался для производства электроэнергии. Таким образом, английские ученые являются первооткрывателями практического применения новой технологии. И уже к 1920-му году ими были разработаны несколько типов установок задачей которых было очищение сточных вод. В 1930 году, с развитием микробиологии, были обнаружены микроорганизмы, участвующие в процессе производства биогаза. В первые биогазовую установку построили в 1938 году Исман и Дюселье, для переработки твёрдых отходов [7].

Российские ученые тоже внесли свой вклад в изучение биогаза и уже в 1974 году Попов начал изучение влияния температуры на количество выделяемого биогаза. Им было выяснено, что при температуре до 50° С, количество выделяемого газа значительно увеличивалось, не меняясь при этом по составу - 1% сероводорода, 30% углекислого газа, 65% метана и незначительное количество азота, кислорода, водорода и закиси углерода. В.Л. Омелянский очень детально изучал природу бескислородного брожения, а так же бактерий, которые участвуют в этом процессе. Газ получался в результате брожения сточных вод и собирался в закрытые емкости [8].

В 1981 г. была запущена серия мероприятий, посвященных программе развития биогазовой отрасли промышленности. Были приняты Постановления



Правительства СССР о производстве биогаза из отходов сельского хозяйства, сточных вод и твердых отходов. Однако многие из намечавшихся мероприятий по освоению технологии анаэробной переработки биомассы остались невыполненными из-за нехватки денежных средств и материальных ресурсов. Так как стоимость биогаза была в пять раз выше природного [2].

Однако, кроме основной цели строительства биогазовых установок – получение энергии из отходов сельского хозяйства, есть дополнительные преимущества, которые можно извлекать из отходов биогазового производства. Так в результате сбраживания получают остаток, который обозначают разными терминами: эффлюент, биоудобрение, дигестат, биогазовый осадок, биошлам и т.д.. Сепарированный эффлюент состоит из твердой (шлам) и жидкой (фугат) фракции. Так как жидкая фракция содержит около 5% сухого вещества и в основном состоит из азота и калия, то ее используют как биоудобрения, разбрызгивая на полях, или повторно загружают в анаэробный реактор, смешав с твердым сырьем. Эффлюент представляет собой органическую массу (влажностью 87–98% и рН 7,3–9,0) улучшенного состава и практически лишенную неприятного запаха. Ценность такой массы заключается в том, что азот в ней сохраняется в аммонийной (до 24% от общего количества N), и органической формах. Фосфор находится в основном в форме фосфатов и нуклеопротеидов, а калий – в виде усвояемых солей (что обеспечивает их лучшую усвояемость растениями). Замечено, что в процессе ферментации содержание фосфора и калия практически не изменяется, однако количество усваиваемого фосфора удваивается. Из других макроэлементов присутствуют кальций (1,0–2,3%), магний (0,3–0,7%), сера (0,2–0,4%), низкие концентрации тяжелых металлов, а также некоторые антибиотики, моносахариды, фитогормоны (гиберрилин, ауксин, цитокенины), аминокислоты, ферменты гидролиза, нуклеиновые, гуминовые и органические кислоты (фульвокислоты), витамины группы В, и другие биологически активные вещества. Таким образом,

биогазовый осадок является источником легкоусвояемых для растений питательных веществ[13].

В своих исследованиях российские ученые отмечают повышение урожайности кукурузы, клубней картофеля на 18%, злаковых газонных трав в 1,3 раза, рассады капусты и томатов на 12–15% . Зарубежными учеными (Д.Я. Костенберг, G. Kocar, M.H. Chantigny, D.A. Angers, G. Belanger, P. Rochette, N. Eriksen–Hamel, S. Bittman и др.), также обнаружили возрастание урожайности и качества возделываемых культур по сравнению с традиционными органическими и минеральными удобрениями : сои, кукурузы, зерновых (пшеницы, ярового ячменя, овса), в том числе зерна . Данные изменения ученые связывают не только с доступностью питательных элементов, но и уменьшением плотности почвы, увеличением ее влагоудерживающей способности под воздействием сброженного осадка. Итальянские исследователи также отмечают возрастание урожайности овощных культур на 6–20%. Некоторые авторы рекомендуют использовать эффлюент для удобрения культур, имеющих короткий период развития, во время которого из почвы интенсивно поглощается азот (что позволяет свести к минимуму его потери) [74].

Твердую фракцию смешивают с другими органическими отходами или с сорбентами: торфом, древесными опилками, землей и т.п. для удобства хранения и транспортировки. Данный твердый отход можно использовать для разрыхления и мульчирования почвы, а также для приготовления почвогрунтов [23].

### 1.3.Преимущества биогаза

На сегодняшний день мировое сообщество уделяет повышенное внимание

проблемам эффективности и рациональности использование энергоресурсов поиска и внедрения технологий использующих возобновляемые источники энергии [3].

Развитие возобновляемой энергетики сегодня приняло ускоренный характер. С одной стороны, это связано с ограниченностью геологических запасов основных видов топливных ресурсов – нефти и газа, что приводит к неизбежному росту цен на них. С другой стороны, с ростом негативного влияния экологических факторов, вызванных последствиями жизнедеятельности человека. Основным экологический ущерб, связанный с глобальным изменением климата Земли, – парниковым эффектом, наносят, главным образом, добыча, переработка и сжигание ископаемых видов топлива – угля, нефти и газа. В этой связи удовлетворение нарастающих потребностей населения мира в топливе, электрической и тепловой энергии одновременно с обеспечением экологической безопасности обуславливает необходимость развития возобновляемой энергетики, ведь нефть – не единственное сырье для получения высокооктановой органики для двигателей. Так как современная экономика направлена на развитие энерго- и ресурсосберегающих технологий, то наиболее перспективным направлением в производстве биотоплива является производство биогаза [4].

Одним из главных преимуществ биогаза является то, что на той местности, где начинают производить и использовать биогаз, заметно улучшается экологическая обстановка. Постройка биогазовой станции, не только решает проблемы с энергией данной местности, но и способствует эффективной утилизации отходов органического происхождения, а также обработке сточных вод [8].

Вторым же главным преимуществом считается то, что производство биогаза невероятно выгодно с экономической точки зрения. Обслуживание биогазовых установок достаточно дешево. При постоянно растущих ценах на

энергоносители, реализованный на фермерском хозяйстве проект по добыче биогаза из отходов, начнет приносить прибыль через 3 – 5 лет после старта.

И, наконец, третье, главное преимущество заключается в том, что при наличии достаточного количества сырья, постройка биогазовой станции станет великолепной альтернативой одному из проектов по возведению объекта традиционной энергетики, такого как строительство газопровода, или котельной на угле или солярке, и т.д. [26].

Крупные агропромышленные комплексы, фермы, птицефабрики, рыбные заводы, хлебобулочные комбинатам, предприятия пищевой промышленности, мясокомбинаты являются основными потребителями продукции биогазовых установок.. Применяется такая установка не только в качестве альтернативного источника энергии, но и как эффективная технология утилизации навоза (помета) и производства дешевого удобрения, как для собственных нужд, так и для реализации на рынке.

Сегодня биогазовые технологии стали стандартом для очистки сточных вод и переработки сельскохозяйственных твердых отходов и поэтому используются во многих странах мира [1].

#### 1.4.Виды сырья для производства биогаза

В настоящее время с помощью современной технологии можно перерабатывать любые виды органического сырья для получения биогаза. К таким видам сырья можно отнести навоз, птичий помёт, свекольный жом, отходы забойного цеха (кровь, жир кишки и прочее),а так же бытовые отходы. Качество сырья характеризуется содержанием в нём метана (чем выше, тем лучше) и влажностью (чем она ниже, тем лучше). В среднем из тонны навоза

крупного рогатого скота получается 55-67 куб. м биогаза с содержанием 60% метана, из различных видов энергетических растений – 200-510 куб.м с 70% метана. Большое количество биогаза – 1200 куб.м с содержанием метана 88% - можно получить из животного жира. Получаемый биогаз может сжигаться для обогрева промышленных теплиц, фермерских хозяйств и т.д [33].

Основные виды доступной биомассы:

1. Отходы сельского хозяйства (животноводство, растениеводство)
  - навоз КРС,
  - свиной навоз,
  - куриный помет,
  - солома
  - ботва сахарной свеклы;
2. Отходы пищевой промышленности,
  - жом сахарной свеклы,
  - спиртовая барда,
  - молочная сыворотка;
3. Отходы лесного хозяйства;
4. Твердые бытовые отходы (ТБО);
5. Осадок , сточных вод.

Однако основное возобновляемое сырьё для биогазовых установок - это энергетические растения. Сельскохозяйственное производство получило совершенно новое направление после того как для получения биогаза начали использовать растительных культур. Раньше сельское хозяйство занималось производством корма и продуктов питания, а сейчас же все большее количество площадей отдаётся под выращивание энергетических растений, для того чтоб в дальнейшем направить их на производство биогаза в биогазовых установках [45].

Данное дело стало главным источником дохода для некоторых фермеров и поэтому оно стало отдельной отраслью по выращиванию энергетических растений [24].

Лишь несколько видов растений, выращенных на полях культур, являются пригодными для использования в биогазовых установках и являются энергетическими [11].

На сегодня одним из таких растений считается силосовая кукуруза. Она является самым важным видом культур для использования в биогазовых установках. Техника, которая необходима для переработки этой культуры, как правило всегда есть в наличии на производственном предприятии либо не дорогая. Плюс кукурузы заключается в том, что она очень легко силосуется и не вызывает проблем и нарушения работы биогазовой станции даже при использовании в чистом виде. На сегодняшний день появились сорта, которые специально используют в биогазовых установках. Они дают достаточно большой выход биомассы. А более поздние урожаи получают благодаря таким же более поздним сортам. Во время сбора, кукуруза должна иметь как правило 29-36% содержание сухого вещества, а также оставаться в состоянии между её пригодностью для муки и молочной спелостью. Большой выход метана от поздних сортов, в размере более чем 8000 м<sup>3</sup> метана/га можно получить в благоприятных районах выращивания [16].

Силос из зерновых растений имеет большую популярность, ведь он очень хорошо подходит для севооборота. Растения, которые называют энергетическими, при низких весенних температурах могут давать хороший и стабильный урожай, а так же выращиваться на глинистых грунтах. Таким образом, часто как неприхотливое озимое растение используют рожь. Но подходят все виды зерновых культур. В зависимости от конкретной местности, должен осуществляться выбор. Когда зерно уже пригодно для теста, другими словами, когда зерно налито и не выделяет сок при сжимании, а само зерно

можно выдавить из шелухи, это является оптимальным временем для сбора урожая. Тогда содержание сухого вещества будет составлять 35-40%. Это является лучшим временем, когда возможно максимальное переваривание растения целиком, а так же доступна максимальная плотность энергии. Зерно в отличии от кукурузы, не так хорошо силосовать, поэтому чтобы можно было расщеплять его и чтобы в силосном бункере можно было достигнуть быстрого окисления, а таким образом и хорошей плотности, необходимо, чтобы длина сечки как можно точнее соответствовала 4мм. Выход находится в пределах от 80 до 140 центнера/га. Большое количество сырого протеина и азота ( $N_2$ ) содержится в силосе с целых зерновых растений, так же как и в травах.. Их высокий процент в смеси субстратов или слишком большая нагрузка бродильной камеры могут привести к задержке вызванной аммиаком [15, 32].

Выращивание энергетических культур целенаправленно для производства биогаза, вызывает необходимость траты денег на их уборку и посев. Этот факт является главным отличием от других источников сырья для ферментёров. Переработка отходов овощеводства и производства зерновых культур в биогаз имеет высокую экономическую эффективность, что так же позволяет получить значительное количество биогаза [13,48].

Одной из наиболее благоприятной культурой для получения твёрдого биотоплива является ива, а второй такой культурой считается тополь. Комбинированное производство тепловой и электрической энергии в местных системах отопления уже используется в Швеции и Дании. Так же на сегодня есть много станций, которые комбинируют сжигание угля с добавлением биотоплива, такого как солома или щепки, что приводит к уменьшению потребления ископаемого топлива, а так же вредные выбросы в атмосферу.

Само использование двух видов биомасс, таких как специально выращенных и удалённой из отходов производства или коммунальных свалок, является трудозатратным процессом [10].

Из одной тонны разнотравья можно получить около 290–490 м<sup>3</sup> биогаза наиболее энергоемким является клевер: 430–490 м<sup>3</sup>. А из тонны картофельной ботвы можно получить до 490 м<sup>3</sup>, из тонны свекольной – от 75 до 200 м<sup>3</sup>, из одной тонны ржаных отходов, - 165 м<sup>3</sup>, тонна льна и конопли – 360 м<sup>3</sup>, из тонны овсяной соломы - 310 м<sup>3</sup> [17].

Итак, наиболее продуктивно использовать в биогазовой установке следующее сырьё: кукурузный силос молочной и восковой спелости, суданскую траву, травяной силос с лугов, смесь клевера с другими травами, силос из зерновых культур, сахарную и кормовую свеклу вместе с ботвой, картофель, зерновые. Сырьё растительного происхождения имеет высокое содержание сухих веществ по сравнению с другими видами сырья [21].

### 1.5. Основные характеристики сырья для получения биогаза

Чтобы повысить объем биогаза, получаемого из ферментируемых масс, необходимо поддерживать высокую активность микроорганизмов. Для этого необходима определённая вязкость субстрата. Перед загрузкой сырьевой массы в биореакторы, её измельчают и осторожно перемешивают, чтобы избежать образование корки, приводящей к расслоению субстрата, а так же к прекращению выхода биогаза. Это может произойти, если в сырьё присутствуют сухие, твёрдые и крупные элементы, что ведёт к замедлению метанового брожения и образованию всего вышеперечисленного [3].

Сероводород и водяной пар влияют на качество биогаза. Сероводород очень агрессивен, ведь может вызывать коррозию различных частей газового оборудования и снижает экологическую ценность топлива, а водяной пар ухудшает способность горения топлива. Наиболее экологически чистым будет



биогаз, в котором не содержится сероводорода. В составе биогаза в незначительном количестве присутствуют и другие газообразные вещества, такие как азот, водород, аммиак и кислород [29].

Так же, для того, чтобы увеличить выход биогаза разные виды сырья смешивают друг с другом посредством кавитационной переработки субстрата. Так достигают оптимальных соотношений углекислого газа и азота: в обрабатываемой биомассе они должны обеспечиваться в пропорции 16 к 10 [13].

## 1.6. Этапы производства биогаза

### 1.6.1. Подготовка сырья

Как было сказано выше- чем мельче нарезано сырьё, тем лучше будет идти процесс производства биогаза, поэтому перед началом работы, сырьё очищают от твёрдых и тяжёлых элементов, такие как камни, которые обычно опускаются на дно приёмной ёмкости и потом дополнительно измельчают и всё это происходит перед тем, как подавать сырьё дальше в приёмную ёмкость [20].

### 1.6.2. Подача субстрата

У каждой группы бактерий свои продукты обмена веществ и они в свою очередь являются питательными веществами последующей группы бактерий, но каждая такая группа работает с разной скоростью и поэтому в каждом конкретном проекте рассчитывают и программируют периодичность подачи

субстрата, ведь бактерии нельзя «перекармливать» так как одна из групп не успеет произвести еду для следующей [27].

### 1.6.3.Период брожения

Количество произведённого газа постепенно растёт соответственно увеличению длительности брожения, вначале оно происходит быстрее, по мере продолжительности брожения – медленнее. В итоге наступает такой момент, когда дальнейшее пребывание в ферментаторе будет нецелесообразно с экономической точки зрения. Специалисты используют научный подход и опираются на многолетний опыт при расчёте эффективного времени пребывания бактерий в реакторе [18].

### 1.6.4.Перемешивание

Перемешивание помогает избежать появления корки и осадка, а так же выводит биогаз на поверхность, ведь при перемешивании пузыри газа поднимаются [26,68].

### 1.6.5.Стабилизация процесса

Микроорганизмы привыкают к определённому «рациону» и поэтому

последующие изменения должны вноситься постепенно. Так же необходимо избежать попадания в биореактор таких веществ как химические и дезинфицирующие средства, антибиотики, кислоты и большого количества тяжёлых металлов [19, 72].

## 1.7. Процесс образования биогаза

### 1.7.1. Этапы процесса

Биогаз является продуктом обмена веществ бактерий, образующийся вследствие разложения ими органического субстрата. Сам процесс разложения можно разделить на 4 этапа, в каждом из которых участие принимают много разных групп бактерий [30,73]:

1 В первой стадии белки, жиры и углеводы, которые находятся в биомассе, под воздействием энзимов (гидролитических ферментов) распадаются на простые органические соединения, такие как аминокислоты, сахар, жирные кислоты. Данная стадия происходит под воздействием ацетогенных бактерий и называется стадией гидролиза [55].

2. Далее в процессе расщепления участвуют кислотообразующие бактерии. Некоторые молекулы продолжают разлагаться после проникновения в клетки бактерий. Анаэробные бактерии частично принимают участие в этом процессе и употребляют остатки кислорода, образуя тем самым те самые главные и необходимые анаэробные условия для метановых бактерий. Этот этап называют фазой окисления (уровень pH понижается) [58].

3. После фазы окисления происходит переработка сложных спиртов за счёт бактерий. Всё это происходит с выделением водорода и разложением до уксусной и муравьиной кислот, а так же метанола [4, 71].

4. На последнем стадии в работу вступают метанообразующие бактерии и образуется метан, а так же двуокись углерода и вода как продукт жизнедеятельности метановых бактерий с уксусной и муравьиной кислотами, углерода и водорода. 90% всего метана вырабатывается на этом этапе, 70% происходит из уксусной кислоты. Таким образом, образование уксусной кислоты (т.е 3 этап расщепления) является фактором, определяющим скорость образования метана. Метановые бактерии исключительно анаэробные. Поэтому одним из основных результатов анаэробной переработки является образование биогаза, который состоит из метана и углекислого газа, а так же сероводорода, аммиака и оксидов азота [31].

### 1.7.2. Типы ферментации

#### Мезофильный тип ферментации

##### Плюсы

- При отклонении температуры на 1-2°C от оптимума производительность газа практически не снижается;
- На поддержание температуры затрачивается меньше энергии [33].

##### Минусы

- Происходит меньшая интенсивность выделения газа
- Для полного разложения субстрата, затрачивается больше время -25 дней.
- Биошла, который был получен при данном режиме, не является стерильным [5, 76].

#### Термофильный тип ферментации

##### Плюсы

- Газ выделяется интенсивнее;
- Времени до полного разложения субстрата требуется меньше - 12 дней.
- Биошлам, который был получен при данном режиме является полностью стерильным, благодаря чему его применяют в качестве кормовых добавок животным [11].

#### Минусы

- При отклонении температуры на 1-2<sup>o</sup>C, производительность газа снижается значительно;
- На поддержание температуры требуется затраты энергии.
- Сырьём для использования в биогазовой установке может быть навоз домашних животных, растительная масса и другие органические остатки. Благодаря разнообразию субстрата, производительность биогаза варьирует от того, какой субстрат используют [70].

### 1.8. Фазы производства биогаза

Фазы производства биогаза разделяют на гидролизную фазу, ферментацию, анаэробное окисление и метаногенез [54].

#### 1.8.1. Гидролизная фаза

Первым этапом в процессе разложения является гидролиз. На данном этапе жиры, сахара и белки преобразуются в меньшие органические соединения: а именно простые сахара, amino- и жирные кислоты, а так же некоторые спирты.

Гидролизная фаза очень важна, поскольку органические молекулы большого размера просто очень велики, чтобы быть поглощёнными и чтоб их могли использовать микроорганизмы в качестве сырья или источника пищи. Некоторые микроорганизмы выделяют различные внеклеточные ферменты (энзимы), которые также называют ферментами, которые «разрезают» крупные молекулы на части поменьше, чтоб микроорганизм мог затем принимать эти части внутрь и использовать их в качестве питательных веществ, а так же в качестве источника энергии. Они выделяют их для достижения биodeградации.

Так же некоторые микроорганизмы выделяют несколько различных ферментов, которые в дальнейшем позволяют им разломать различные типы органических материалов. Другие микроорганизмы выделяют ферменты, которые расщепляют сахара или белки и сами эти микроорганизмы являются специализируемыми. Те микроорганизмы, которые ломают различные сахара, называются сахаролитическими, а те, которые расщепляют белки называются протеолитическими [36, 67].

### 1.8.2. Ферментация

Стадия ферментации так же состоит из нескольких реакций, как и стадия гидролиза. В зависимости от того, какими организмами осуществляются реакции и от того какой субстрат перерабатывается в ходе процесса, зависит то, какие точно реакции проходят. Большое количество организмов проявляют активность в процессе прохождения фазы ферментации, Данное количество даже больше чем при других фазах. Многие из тех организмов, что проводят ферментацию, являются теми же организмами, что осуществляли гидролиз в момент первого этапа. Так же в этом процессе активны и другие виды

микроорганизмов, таких как, Энтеробактериумы, Бактериоды, Ацетобактериумы и Эубактериумы [49, 69].

Во время процесса ферментации, продукты, полученные в результате первого этапа (источники углерода и энергии) задействованы рядом микроорганизмов в качестве сырья. В качестве сырья для ферментационных микроорганизмов используются сахара, спирты, аминокислоты и так далее. А с другой стороны жирные кислоты, которые были получены при расщеплении жиров и ароматических структур, не используются ферментативными микроорганизмами. Вместо этого они не разрушаются до следующего этапа в цепи разложения (анаэробного окисления) [36].

Продукты гидролиза преобразуются главным образом в различные органические кислоты, спирты, аммиак, диоксид углерода и водород., путем различных ферментационных реакций. Источник субстрата, природа процесса, а также то, какие организмы присутствуют в процессе второй фазы, влияют на то, какие именно соединения будут образовываться. Заряженная форма (без протонов) находится в равновесии с незаряженной формой и это является типичным для кислот, что образовались [2, 14].

### 1.8.3. Анаэробное окисление

Продукты, которые образуются в результате ферментации, после данного процесса расщепляются в процессе анаэробных окислительных реакций. Этот процесс является важным шагом в выработке биогаза. Ему требуется тесное сотрудничество между организмами, которые в свою очередь осуществляют окисление и организмами, которые принимают активное участие в следующем этапе, фактическом образовании метана. Причину по которой две различные

группы организмов должны работать вместе не так просто объяснить, ведь она очень сложна, но если коротко, то можно сказать, что это явление тесно связано газообразным водородом, точнее с его концентрацией. Газообразный водород выделяется за счёт того, что в процессе анаэробного окисления, протоны используются в качестве окончательных акцепторов электронов. Только благодаря тому, что концентрация водорода постоянно поддерживается на очень низком уровне и происходит образование газообразного водорода. Процесс анаэробного окисления будет остановлен, если газообразный водород, который образовался в процессе, не будет удаляться, ведь микроорганизмы больше не будут получать достаточно энергии для роста [11, 56, 68].

#### 1.8.4. Метаногенез

Метан, углекислый газ и вода, является продуктами разложения уксусной кислоты. В свою очередь углекислый газ и водород превращаются в метан и воду. Метаногенез является очень выгодным в энергетическом отношении из-за трансформации органических веществ в топлива, поскольку в ходе такого процесса как метановое брожение, сохраняется до 83% энергии, затрачиваемой глюкозы. Такой пример и считается ярким показателем вышесказанного.

Оценка качества биогаза, который был произведён, происходит в первую очередь благодаря содержанию метана или же по соотношению двух веществ, таких как горючий метан ( $\text{CH}_4$ ) и двуокись углерода ( $\text{CO}_2$ ). Минус присутствия двуокиси углерода в том, что она разбавляет биогаз и вызывает его потери при хранении. Именно из-за этого необходимо стремиться к высокому содержанию метана, а содержание двуокиси углерода должно быть как можно ниже. Содержание метана обычно варьирует от 60 до 75% [30].



## 1.9. Содержание метана в биогазе

### 1.9.1. Процесс выделения газа

В одноступенчатых БГУ весь процесс разложения под воздействием анаэробов происходит в одном биореакторе и полученный газ выделяется не как просто газ, а как смесь газов. В двуступенчатых установках после первой фазы выделяется газ с большим содержанием двуокиси, а вот уже на второй фазе газ имеет высокий процент содержания метана, который в свою очередь составляет более 80% [25].

### 1.9.2. Состав питательных веществ субстрата

Количество веществ и их состав значительно влияет на количество и качество биогаза, что будет производиться, поскольку протеины и жиры имеют высокое содержание метана. Из богатых на углеводы субстратов, такие как например, кукуруза можно рассчитывать в среднем на 54% содержания метана [37, 61].

### 1.9.3. Температура субстрата

При высокой температуре биореактора выход метана ниже, чем при низких температурах. Всё это зависит от образования газовой двуокиси углерода, ведь чем больше её количества перейдет в газовую форму, тем

меньше будет процентная доля метана в биогазе [6, 41].

Сероводород является одним из важных составляющих газа, после двуокиси углерода, а так же метана. Есть необходимость очищать биогаз от серы, поскольку сероводород является очень агрессивным и вызывает коррозию, что приносит проблемы с газовыми счётчиками, горелками и двигателями [59].

### 1.10. Метан и биоудобрения

Органические вещества, которые используют для получения биогаза являются отходами различных отраслей народного хозяйства. Переработка навозной смеси, что была специально приготовлена, и других отходов, таких как сельскохозяйственные отходы, промышленные или коммунальные, называется коферментацией. Цель данного процесса – это снижение загрязнения окружающей среды, а так же использование энергетического потенциала органических остатков [12, 48].

При отсутствии БГУ обычный навоз или же другие отходы нельзя использовать в качестве удобрения с той же эффективностью больше 3-5 лет. В то время как при наличии и использовании биогазовой установки, биоотходы перепревают и полученную массу тут же можно использовать как высокоэффективное удобрение. Биосубстрат, полученный после удаления из него газа, а так же после обработки его бактериями, представляет из себя экологически чистые, жидкие органические удобрения, что лишены нитратов, семян сорняков, а так же болезнетворной микрофлоры. Тем самым, внесение таких вот удобрений в почву повышает урожай и что не мало важно улучшает качество земли [26].

Решением большинства экологических проблем является утилизация органических отходов, которые остаются в процессе жизнедеятельности человека. Выгодным местом для установки БГУ являются мясокомбинаты, местные фермы, а так же очистные сооружения, поскольку эти места благоприятны для энергетической независимости, а так же производства электричества и тепловой энергии из отходов, что дают производства. Экономически эффективная утилизация навоза в больших количествах – важнейший аргумент для современного интенсивного сельского хозяйства [17].

Прибыль, что получается дополнительной, можно направить на погашение кредита и на развитие самого производства. Улучшения и развитие производства заключается в том, чтобы как можно меньше было энергетической зависимости, выбросов парниковых газов, а так же загрязнения среды, что нас окружает [27].

Технический прогресс не стоит на месте и это видно из того, что раньше всё вышесказанное было затратным и дорогим, а сейчас же всё совершенно иначе. Современные БГУ оснащаются модулями для полной очистки биогаза, а это в свою очередь приводит к тому, что в результате нескольких технологических операций, содержание метана увеличивается больше 80% и доходить до 90% , а побочные газы удаляются [35].

### 1.11. Методы исследования активности микрофлоры сырья

Методы исследования активности микрофлоры сырья подразделяются, на сахаролитическую, каталазную, протеолитическую [4].

### 1.11.1. Определение сахаролитической активности

Для этого используют «Пестрый» ряд Гисса, который бывает жидким и полужидким.

Жидкие среды Гисса: дистиллированная вода, пептон, поваренная соль, определенный углевод (глюкозу, лактозу, сахарозу, маннит, мальтозу), индикатор (Андрее, или бромтимолблау, или ВР-водный голубой 4-розовая кислота. Разливают в пробирки по 3 мл. Для обнаружения газов, являющихся конечными продуктами распада сахаров, в каждую пробирку опускают «поплавок»-трубочку диаметром 0,5-0,7 см, запаянную с одного конца. «Поплавок» погружают в среду запаянным концом кверху. При стерилизации среды он полностью заполняется средой. Ряд Гисса содержит обычно по 5 пробирок со следующими углеводами: глюкозой, мальтозой, сахарозой, лактозой, маннитом. При расщеплении сахаров среда приобретает светлый цвет. Чем более патогенная флора, тем меньше пробирок светлого цвета [54].

Андрее-среды свежеприготовленные, до внесения имеют соломенно-желтый цвет; при расщеплении углевода до кислоты, цвет изменяется до ярко-розового цвета [28].

### 1.11.2. Определение каталазной активности

Сущность изобретения: пробу биологического материала обрабатывают 1% -ой перекисью водорода. И после добавления, если выделяется кислород, то значит, происходит активность [5].

Изобретение относится к энзимологии и может быть использовано в сельском хозяйстве, медицине и пищевой промышленности [13].

Известен газометрический способ определения активности каталазы по Варбургу и его модификации. Сущность этого способа заключается в улавливании и измерении объема выделившегося кислорода после прибавления к водному раствору перекиси водорода экстракта каталазы [24].

Недостатками этого способа являются необходимость расчета и учета постоянного объема сосуда, зависимость от внешних условий (температуры, высоты местности над уровнем моря и атмосферным давлением), необходимость в приспособлении для механического взбалтывания прибора и по возможности исключения прикосновения руками к колбе или склянке [73].

### 1.11.3.Тест Фогеса — Проскауэра

Метод обнаружения бактерий семейства *Enterobacteriaceae* и *Vibrionaceae*, а также спорообразующих аэробных бактерий, основанный на том, что при их культивировании на среде Кларка накапливается ацетоин (продукт анаэробного превращения глюкозы), обнаруживаемый по розовому окрашиванию среды после добавления раствора  $\alpha$ -нафтола и едкого калия [18].

Для постановки реакции Фогеса–Проскауэра культуру выращивают на среде Кларка при температуре  $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$  в течение 24–72 ч. Затем к 1 мл микробной культуры добавляют 0,6мл альфа-нафтола (5 % раствор в этиловом спирте) и 0,2 мл 40 % раствора калия гидроксида и взбалтывают. При положительной реакции наблюдается вишнево-красное окрашивание [25].

Положительный контроль – *Enterobacter aerogenes*, *Serratia marcescens*.

Отрицательный контроль – *Escherichia coli*.

#### 1.11.4. Определение протеолитической активности

Для определения протеолитической активности необходимо приготовить молочный агар, Далее посев на среду осуществляется «штрихом» и после, чашки ставят в термостат при температуре 30°C. Если среда становится прозрачной, то это наглядный пример того, что реакция идёт [46].

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальная часть диссертационной работы была выполнена на кафедре биотехнологии и микробиологии Института инженерных технологий и естественных наук ФГАОУ ВО НИУ БелГУ с 30.11.2017 по 10.06.2018

### 2.1. Объект исследования

Объектом исследования было взято сырьё – Силос, отобранный на биогазовой станции Лучки, компании ООО «АльтЭнерго», находящейся в Прохоровском районе Белгородской области. Фотография сырья представлена на рисунке 2.1.1.



Рис. 2.1.1. Предметом исследования стала активность микрофлоры сырья (силос)

## 2.2. Отбор проб

Отбор проб производился путём снятия верхнего слоя 10-15 см и забором материала до 1кг. Проба силоса помещалась в плотный пакет при этом его хорошо уплотняли для вытеснения воздуха.

## 2.3. Анализ микрофлоры силоса методом разбавления.

### 2.3.1. Приготовление питательных сред.

Для микробиологического исследования сыра нами были приготовлены две питательные среды: питательный агар (МПА) (рис. 2.3.1.1.) и ЛЕВИНА (рис. 2.3.1.2.).



Рис.2.3.1.1. Питательный агар (МПА)



Рис.2.3.1.2. Питательный агар (Левина)

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



Для приготовления питательной среды Левина, мы наливали дистиллированную воду, в объёме 150 мл, в коническую колбу, а после этого, размешивая, насыпали 6 г среды Левина. Количество насыпанной среды рассчитывали по пропорции на 1 литр дистиллированной воды необходимо 40г среды. После, закрывали колбу пробкой и доводили содержимое колбы до начала кипения на плитке. Цвет среды менялся на красный. Далее, мы ставили среду в автоклав при температуре 120°C и давлении в 1 атм в течении 20 минут (фаза выдержки) для того, что она приготовилась полностью.

Среду МПА мы готовили по тому же принципу, что и среду Левина. В коническую колбу наливали 150 мл дистиллированной воды и помешивали, одновременно добавляя в неё 6 грамм среды из расчёта по той же пропорции: 1л дистиллированной воды на 40 грамм среды. Среды так же ставили в автоклав при температуре 120°C в течении 20 минут.

Затем, как среда приготовится и простерилизуется, мы разливали её под пламенем горелки (в радиусе 10-15 см) в чашки, что были заранее приготовлены, а так же простерилизованы в сушильном шкафу при температуре 170°C в течение 2 часов. Мы разливали среду, покачивая чашки, чтобы распределить среду по всему дну чашки. Далее оставляли их стоять на ровной поверхности, чтобы среда не была под наклоном в чашке.

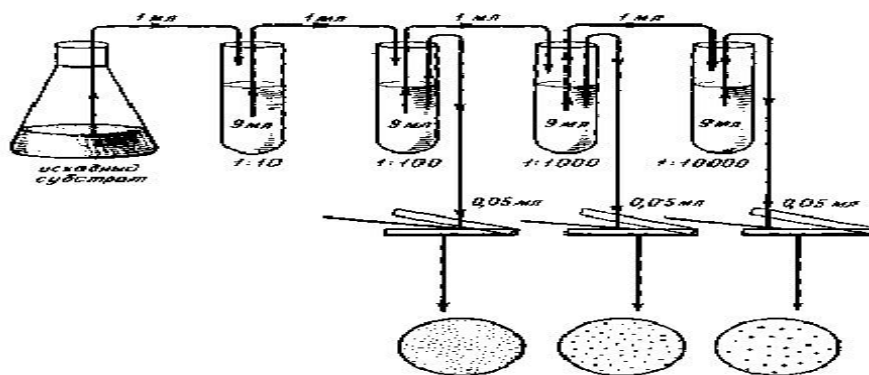
### 2.3.2. Приготовление разбавлений

Согласно ГОСТ Р 53430-2009, для микробиологического анализа мы использовали разбавления –1:1000000.

Для приготовления разбавлений брали водопроводную воду и разливали её по пяти стерильным пробиркам в объёме 9,3 мл и 85мл в небольшую коническую колбу. Далее всё это автоклавировали вместе со средами.

Далее сырьё взвешивали в размере 10г на лабораторных весах, после чего добавляли его в ступку и растирали до стояния «каши», после, полученную «кашу» заливали водопроводной водой и из колбы и перемешивали.. Это и будет считаться первым разбавлением (1:10). Позднее, после того как твёрдая часть субстрата осядет на дне, мы брали 1 мл исследуемой суспензии с помощью дозатора и переносили её в одну из пяти пробирок с объёмом воды 9,3, заготовленных ранее. Этим мы получали второе разбавление (10:100). После добавления суспензии в пробирку, мы тщательно перемешивали её содержимое и в дальнейшем вновь брали 1 мл суспензии, но уже из данной пробирки и добавляли в следующую, тем самым получая третье разведение (10:1000). Данную процесс мы повторяли вплоть до пятой пробирки, пока не получили шестое разбавление (10:1000000) [45].

Затем, тщательно взболтав содержимое последней пробирки на вортексе, мы брали по 0.1 мл суспензии и высевали на чашки Петри поверхностным способом, размазывая суспензию равномерно по всей поверхности чашки, стеклянным шпателем, предварительно каждый раз, обжигая его под пламенем горелки, перед тем как распределять [45]. На рисунке 2.2.1.4. представлена схема разбавления пробы при анализе микрофлоры побочных продуктов.



48—50°

15—20 2—4

Рис.2.2.1.4. Схема разбавления пробы при анализе микрофлоры сыря

Для каждой среды мы использовали по двенадцать чашек Петри. В каждую добавляли шестое разведение (1:1000000).

После того как посев был произведён, на боковой стенке чашек Петри мы отмечали степень разбавления и писал номер чашки с температурой и датой посева. Каждую чашку помещали в термостат так, чтоб крышки находились внизу, поскольку это предотвращает появление конденсата.

### 2.3.3. Подсчет колоний микроорганизмов

После того как в чашках появились колонии, их рассматривали через стекло, не открывая при этом саму чашку Петри. В зависимости от количества колоний считали разными способами. Если колоний было не так много, то считали всех на поверхности чашки Петри, а при большом количестве колоний чашку делили на восемь секторов и производили подсчёт в трёх секторах, из этих цифр брали среднее значение и умножали на общее количество секторов. Описание выросших на среде колоний, производили по таким показателям как

форма, характер поверхности, цвет и край [38].

## 2.4. Методы приготовления микроскопических препаратов

### 2.4.1 Метод раздавленной капли

На середину чистого предметного стекла мы наносили каплю водопроводной воды, затем стерильной петлей добавляли в нее небольшое количество бактерий и хорошо размешивают. Каплю сверху накрывали покровным стеклом, предварительно подкрасив ее красителем, и рассматривали при большом увеличении. Затем готовый препарат мы поместили на столик микроскопа. Далее медленно при помощи микрометрического винта приподнимали объектив до появления в поле зрения изучаемого объекта. Дальнейшая фокусировка производится микрометрическим винтом. В поле зрения микроскопа наблюдали подвижность микроорганизмов.

### 2.4.2. Фиксированный препарат

Данный метод мы использовали для определения формы бактериальных клеток. В начале мы приготовили мазок, который высушивали над пламенем спиртовки. В этот момент очень важно было не допустить перегрева мазка, так как при этом может произойти свертывание белков протоплазмы бактериальной клетки. Затем мы производили фиксирование препарата путем быстрого проведения покровного стекла над пламенем горелки, что обеспечивает лучшее прикрепление мазка к стеклу. После этого – окрашивали препарат раствором

карболового фуксина, промывали водопроводной водой, высушивали и рассматривали при большом увеличении [39].

#### 2.4.3. Метод окраски по Граму

Способность микроорганизмов удерживать красители трифенилметанового ряда – это основа данного метода.

Нами был приготовлен фиксированный мазок на чистом предметном стекле, поверх мазка была помещена полоска фильтровальной бумаги, после чего мы наносили краситель. Спустя 1-2 минуты, после данного процесса, снимали бумагу и наносили на мазок каплю йода, не смывая при этом ничего. Далее, через минуту, обесцвечивали мазок спиртом и окрашивали красителем (карбоновым фуксином). После, смывали водой остатки красителя, высушивали над пламенем спиртовки и рассматривали под микроскопом при большом увеличении. Грамположительные бактерии окрашивались в сине-фиолетовый цвет, а грамотрицательные в розовый [6, 45].

#### 2.4.4. Метод обнаружения капсул у бактериальных клеток

На чистое предметное стекло в каплю туши стерильной микробиологической петлей добавляли небольшое количество бактериальной суспензии. Далее накрывали покровным стеклом и рассматривали при большом увеличении под микроскопом. Темная область вокруг клеток бактерий – это и есть капсула или слизистый чехол [6, 45].

## 2.5. Методы определения активности микрофлоры сырья

Для определения активности микрофлоры сырья, использовали 3 метода, таких как метод определения протеолитической активности, метод определения сахаролитической активности и определение каталазной активности микроорганизмов.

### 2.5.1. Метод определения протеолитической активности

Чтобы определить и увидеть качественную реакцию протеолитической активности микроорганизмов, мы готовили молочный агар Эйкмана, который разливался в стерильные чашки Петри.

Затем после истечения 10-15 минут, в течение которых среда приобретала твердую консистенцию, производили посев микроорганизмов на поверхность этой питательной среды для получения чистой культуры. Помещали чашки Петри в термостат для роста микроорганизмов. Результат смотрели через 1-2 суток, учитывали наличие прозрачных зон на чашках Петри. Прозрачные зоны, которые образуются вокруг выросших колоний микроорганизмов, говорят о проявлении протеолитической активности, что связано с пептонизацией молочного белка, казеина, протеолитическим ферментом. Для проведения этого типа исследования очень удобно использовать молочный агар Эйкмана, так как прозрачные зоны четко выделяются на молочно-мутном фоне питательной среды.

### 2.5.2. Метод определения каталазной активности

Для определения каталазной активности микроорганизмов учитывали тот факт, что некоторые представители аэробных микроорганизмов в процессе дыхания образуют перекись водорода ( $H_2O_2$ ). Перекись водорода является клеточным ядом и может вызывать гибель клеток. По мере образования перекись расщепляется на воду ( $H_2O$ ) и молекулярный кислород ( $O_2$ ). Этот процесс происходит при участии фермента группы оксиредуктаз, каталазы. Клетки микроорганизма устроены таким образом, что количество перекиси водорода в культуре никогда не достигает высоких концентраций, чтоб не обеспечивать их гибель.

Для определения каталазной активности проводили следующие действия: на поверхность микробной культуры, полученной при посеве и выращенной на плотной питательной среде в чашке Петри, наносят 1—2 мл 1% раствора перекиси водорода так, чтобы она покрывала поверхность культуры тонким слоем. Появление пузырьков газа в слое нанесенной жидкости свидетельствует об образовании кислорода в результате расщепления перекиси водорода под действием фермента каталазы [28].

### 2.5.3. Метод определения сахаролитической активности

Для обнаружения сахаролитической активности ферментов исследуемо й культуры производили посев выделенных бактерий в стерильные чашки Петри с питательной средой Гисса. Данная реакция определения сахаролитической активности называемая также «пестрым» рядом. Для определения

сахаролитической активности «Пестрый» ряд Гисса содержит 5 пробирок со следующими сахарами: глюкозой, лактозой, маннитом, мальтозой и сахарозой. При некоторых исследованиях для более углубленного изучения биохимических показателей выделенных микроорганизмов, ряд Гисса дополняют дульцитом, сорбитом, ксилозой, арабинозой и некоторыми другими сахарами. Другими словами, есть «большой» и «малый» «пестрый ряд». Название «пестрый» ряд Гисса обусловлено тем, что под действием ферментативных реакций, происходящих в клетках микробиологической культуры, одни углеводы остаются неизменными и, следовательно, цвет питательной среды не меняется, в то время как другие сахара расщепляются, образуя кислые продукты распада, которые изменяют цвет индикатора и цвет питательной среды, соответственно, проявляют качественную реакцию на наличие сахаролитической активности [43].

## 2.6. Метод статистической обработки цифровых данных

Математическая статистика нужна прежде всего для того, чтобы планировать опыт. Её основная задача – это определить достоверность полученных в ходе экспериментов данных. Для применения методов математической статистики должны соблюдаться несколько важных условий: в опыте должно быть достаточное количество вариантов, а так же повторностей в каждом опыте, а все варианты должны быть в равных условиях. Один из важных факторов – это оптимизация объёма выборки, другими словами, определение числа образцов для исследования.

В проведенных опытах определяют достоверность различий между средними арифметическими данными исследуемых выборок (образцов).



Данные задачи решают с помощью применения различных критериев достоверности, например, Стьюдента ( $t$ ) и Фишера ( $F$ ). Критерий ( $t$ ) – это показатель, позволяющий судить о надежности выводов, подтверждающих или опровергающих рабочую гипотезу [40].

Лишь в правильно спланированных и проведённых опытах можно применять математическую статистику. Опыты следует немедленно браковать, если они не отвечают необходимым требованиям.

Данные необходимо соответствующим образом подготовить, прежде чем проводить статистическую обработку: округлить, вычислить средние арифметические, а так же выбраковать сомнительные данные.

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

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

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

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

Обработка полученных данных разностным методом включала не-сколько этапов:

- Вычисление среднего арифметического значения по всем повторностям ( $\bar{x}$ );
- Вычисление разности ( $d$ ) между данными по повторностям;
- Определение среднего арифметического разности ( $\bar{d}$ );

- Расчет отклонения между каждой разностью и средним значением ( $d - d_{cp}$ );

- Возведение данного отклонения в квадрат и его суммирование

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

- Вычисление ошибок раз

$$Sd(1 - 2) =; Sd(1 - 3) =.$$

- Вычисление критерия Стьюдента фактического:

$$t(1-2) = (x_{2cp} - x_{1cp}) / Sd(1-2); t(1-3) = (x_{3cp} - x_{1cp}) / Sd(1-3)$$

Фактический критерий мы сравнивали с теоретическим (табличным значением) и делали выводы, пользуясь следующим правилом: если фактический критерий Стьюдента равен теоретическому значению или больше него, то разность между вариантами существенна [47].

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

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

## 2.7. Обработка цифровых данных методом дисперсионного анализа

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

Среднюю арифметическую вычисляли по формуле:  $M = \sum V / n$ ; Где  $M$  – средняя арифметическая;  $\sum$  - знак суммирования;  $V$  – дата, результат

первичного измерения признака у каждого объекта в исследуемой группе;  $n$  – число объектов в группе.  $S$  – дисперсия, сумма квадратов:  $S = \sum (V - M)^2$ ; Где  $S$  дисперсия, сумма квадратов;  $\sum$  - знак суммирования;  $V$  – дата, результат первичного измерения признака у каждого объекта в исследуемой группе;  $M$  – средняя арифметическая.  $\delta$  – среднее квадратичное отклонение:

$\delta = \sqrt{S / (n - 1)}$ ; Где  $\delta$  – среднее квадратичное отклонение;  $S$  – дисперсия, сумма квадратов;  $n$  – число объектов в группе. Ошибка средней арифметической:

$m = \delta / \sqrt{n}$ ; Где  $m$  - ошибка средней арифметической;  $\delta$  – среднее квадратичное отклонение;  $n$  – число объектов в группе. В соответствии с числом степеней свободы, рассчитываемой по формуле:  $\nu = n - 1$ ; Где  $\nu$  - число степеней свободы;  $n$  – число объектов в группе.

### ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### 3.1. Анализ микрофлоры сырья «Силос» при производстве биогаза. Численность микроорганизмов, выросших на питательных средах

Анализ численности КМАиФАНМ проводился нами в исследуемом сырье. Посев производился поверхностным способом на питательный агар, точно соблюдая условия методики.

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

Таблица 3.1.1

Количество колоний КМАиФАНМ в сырье «Силос»  
в разведении  $10^6$  по срокам посева (2018 г.)

Дата инкубации	№ чашки Петри					
	°С	1	2	3	4	5
13.02.18	25	20	53	11	31	4
1 день	34	40	60	58	34	60
14.02.18	25	45	71	117	88	94
2 день	34	140	108	120	140	130
15.02.18	25	175	144	138	193	170
3 день	34	200	160	186	202	205
03.05.18	25	6	0	13	49	57
1 день	34	27	59	27	89	88
4.05.18	25	98	110	86	132	144

2 день	34	140	182	160	181	200
5.05.18	25	179	210	199	208	225
3 день	34	205	253	227	237	248

Таблица 3.1.2

Количество колоний БГКП в сырье «Силос»  
в разведении  $10^6$  по срокам посева (2018 г.)

Дата инкубации	№ чашки Петри					
	°С	1	2	3	4	5
13.02.18 1 день	25	40	53	30	17	23
	34	60	67	37	59	47
14.02.18 2 день	25	74	108	94	80	98
	34	180	170	105	138	142
15.02.18 3 день	25	201	197	153	167	172
	34	210	205	200	192	210
03.05.18 1 день	25	29	24	37	48	39
	34	85	57	81	92	73
4.05.18 2 день	25	101	111	122	148	127
	34	153	163	183	172	167
5.05.18 3 день	25	193	188	212	204	198
	34	218	221	235	229	223

Из данных, приведённых в двух таблицах, можно сделать вывод, что количество КМАиФАНМ при дате 5.05.18 наибольшее, а при 15.02.18 наименьшее. Разница количества колоний, что выросли на чашках Петри в отличное друг от друга время объясняется погодными условиями, которые влияют на активность микроорганизмов, а так же моментом подкормки микроорганизмов, ведь производство биогаза вышло на уровень непрерывного

процесса, вследствие чего некоторые микроорганизмы, населяющие субстрат, замирают или погибают, находясь в условиях так называемого «стресса»

### 3.2. Микроскопическое исследование микрофлоры сырья

Для анализа микрофлоры сырья мы провели микроскопическое исследование колоний, которые выделены из силоса.

Данные колонии мы анализировали по морфологическим признакам: характер поверхности, форма, цвет, край. Так же в ходе исследования мы определяли принадлежность микроорганизмов к грамположительным или к грамотрицательным с помощью метода окраски по Граму.

В ходе проведённого нами анализа на питательном агаре мы обнаружили и определили следующие роды микроорганизмов: *Tatumella*, *Serratia* и *Lactobacillus*. На рисунках 3.2.1., 3.2.2. и 3.2.3 представлены микропрепараты данных бактерий.

Род *Lactobacillus* — род грамположительные анаэробные бактерии. Лактобактерии имеют правильную форму длинной палочки, размером в среднем 0,5x7,0 мкм. Колонии молочнокислых бактерий рода *Lactobacillus* мелкие, гладкие, плоские или слегка выпуклые, бесцветные.

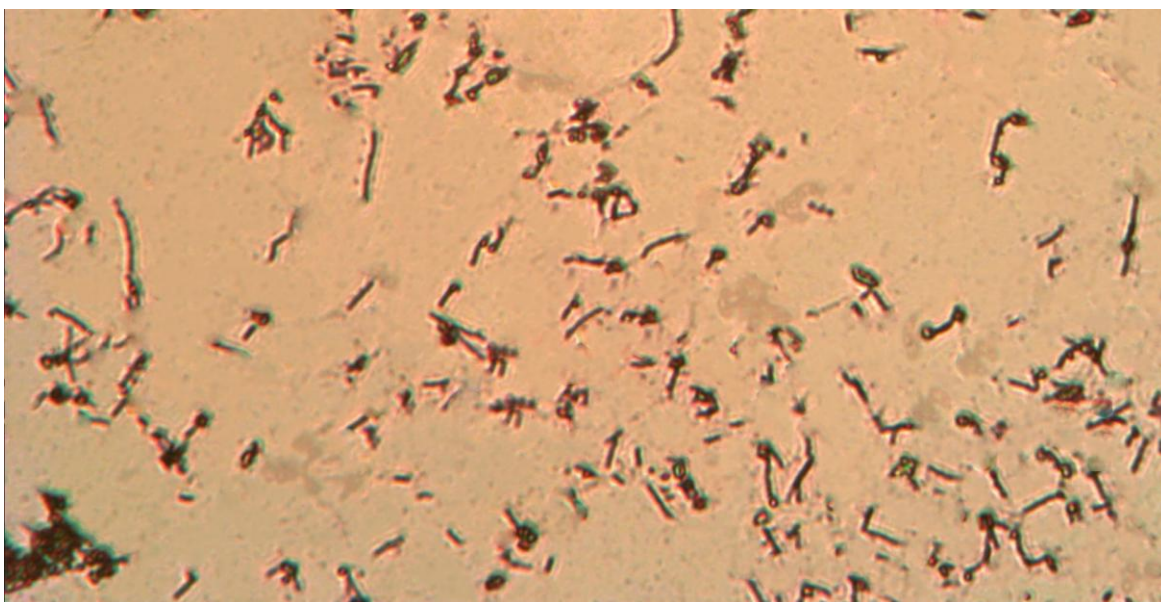


Рис. 3.2.1. Клетки *Lactobacillus* на питательной агаре (МПА). Увеличение X1000



Рис 3.2.2. Клетки *Bacillus* на питательном агаре (МПА) Увеличение X1000

Рода *Bacillus* имеет форму прямой палочки, с прозрачной структурой. Приблизительная толщина *Bacillus* составляет 0,7 микрометра. А в длину такая бацилла может достигать от двух до восьми микрометров.

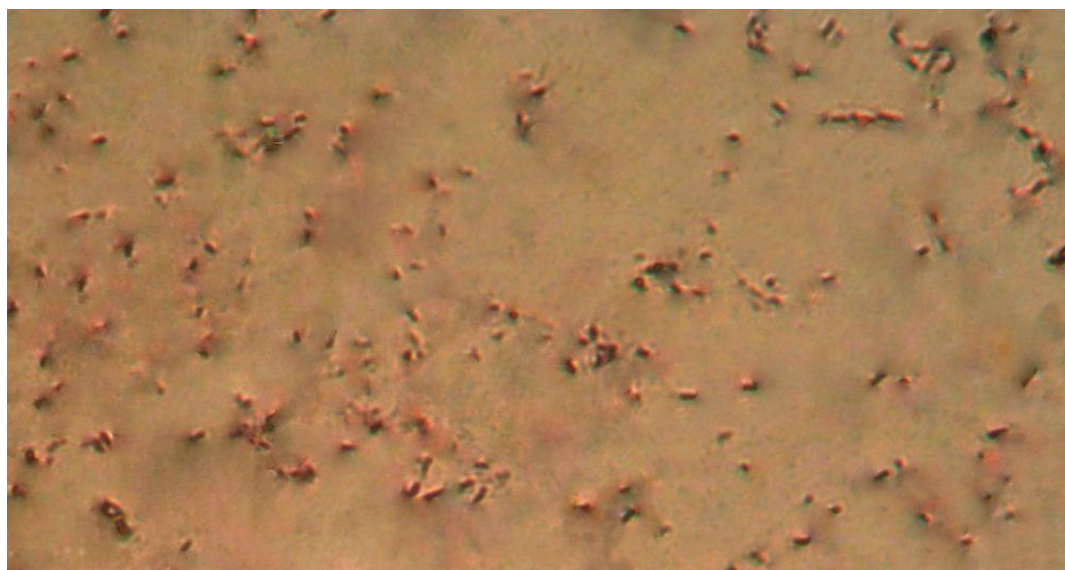


Рис 3.2.3. Клетки *Escherichia* на среде Левина Увеличение X1000

Род *Escherichia* – короткие палочки с закругленными краями, неподвижная, грамотрицательная, споронеобразующая, образуют плоские красные колонии.

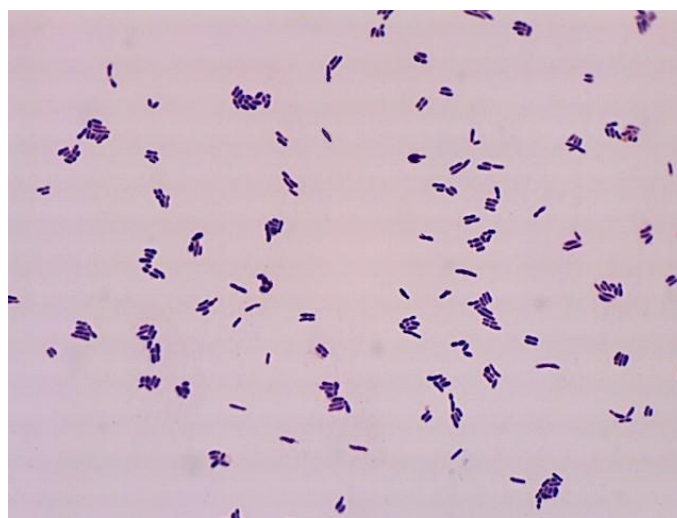


Рис. 3.2.1. Клетки *Tatumella*. Фиксированный препарат, окраска фуксином. Увеличение X1000

*Tatumella* – это мелкие палочки, 0,6-0,8 x 0,9 – 3 мкм. Грамотрицательные. Неподвижные при 36°C. Факультативные анаэробы. Хемоорганотрофы,



обладающие и дыхательным и бродильным типами метаболизма. Хорошо растут при 25-36°C, но метаболически более активны при 25°C. Типовой и единственный вид: *Tatumella ptyseos*. Этот вид метаболически неактивен при 36°C [26].

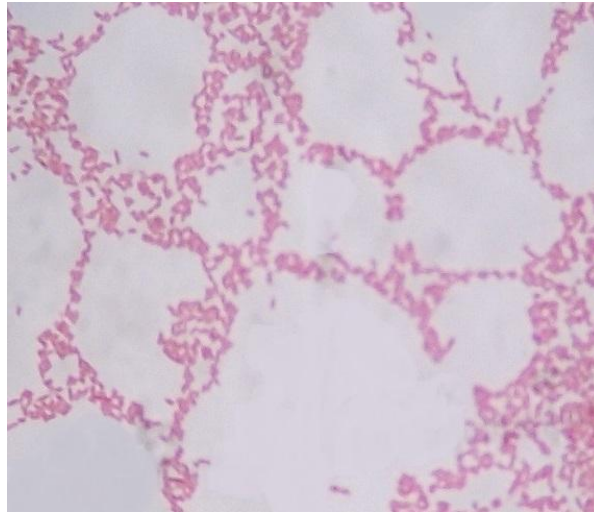


Рис. 3.2.2. Клетки *Serratia*. Фиксированный препарат, окраска фуксином. Увеличение X1000

*Serratia* – прямые палочки, 0,5-0,8 x 0,9-2,0 мкм. Грамотрицательные. Обычно подвижные за счёт перитрихальных жгутиков. Факультативные анаэробы. Хемоорганотрофы, обладающие и дыхательными и бродильными типами метаболизма. Хорошо растут при 30-37°C. *Serratia marcescens* вызывает оппортунистические инфекции у госпитализированных больных – септицемию и инфекции мочевых путей [26].

### 3.3. Статистическая обработка цифровых данных

Обработка цифровых данных проводилась двумя методами: методом дисперсионного анализа и разностным методом.

#### 3.3.1. Обработка цифровых данных дисперсионным методом

Общая численность микроорганизмов в сырье «Силос» представлена в таблицах 3.3.1.1. – 3.3.1.4

Таблица 3.3.1.1

Общая численность КМАиФАНМ в сырье «Силос» по срокам посева (КОЕ/ г)

разбавлени е	сроки	°С	среднее	Стандартная ошибка	Дисперсия	Стандартное отклонение
1*10 <sup>6</sup>	13.02.18	25	23,8	8,59	294,96	19,2
		34	50,4	5,56	123,84	12,44
	14.02.18	25	83	12,02	578	26,88
		34	127,6	6,14	141,04	13,74
	15.02.18	25	164	10,2	414,8	22,77
		34	190,6	8,3	276,64	18,61
	3.05.18	25	25	11,7	546	26,12
		34	58	13,7	756,8	30,75
	4.05.18	25	114	10,7	456	23,87
		34	172,6	10,3	426,24	23,1
	5.05.18	25	204,2	7,5	228,56	16,9
		34	234	8,5	291,2	19,1

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

Таблица 3.3.1.2

КМАиФАНМ (КОЕ/г) сырья «Силос» в разведении 1:10<sup>6</sup> составило

$A_1 = 23,8 / (0,000001 \times 0,1) = 23,8 \times 10^7$	$A_7 = 25 / (0,000001 \times 0,1) = 25 \times 10^7$
$A_2 = 50,4 / (0,000001 \times 0,1) = 50,4 \times 10^7$	$A_8 = 58 / (0,000001 \times 0,1) = 58 \times 10^7$
$A_3 = 83 / (0,000001 \times 0,1) = 83 \times 10^7$	$A_9 = 114 / (0,000001 \times 0,1) = 114 \times 10^7$
$A_4 = 127,6 / (0,000001 \times 0,1) = 127,6 \times 10^7$	$A_{10} = 172,6 / (0,000001 \times 0,1) = 172,6 \times 10^7$
$A_5 = 164 / (0,000001 \times 0,1) = 164 \times 10^7$	$A_{11} = 204,2 / (0,000001 \times 0,1) = 204,2 \times 10^7$
$A_6 = 190,6 / (0,000001 \times 0,1) = 190,6 \times 10^7$	$A_{12} = 234 / (0,000001 \times 0,1) = 234 \times 10^7$

Таблица 3.3.1.3

Общая численность БГКП в сырье «Силос» по срокам посева (КОЕ/г)

разбавлени е	сроки	°С	среднее	Стандартная ошибка	Дисперсия	Стандартное отклонение
1*10 <sup>6</sup>	13.02.18	25	32,6	6,37	162,64	14,25
		34	54	5,33	113,6	12
	14.02.18	25	90,8	6,15	151,36	13,75
		34	147	13,2	697,6	29,53
	15.02.18	25	178	9,14	334,4	20,44
		34	203,4	3,4	46,24	7,6
	3.05.18	25	35,4	4,15	69,04	9,3
		34	77,6	3,02	143,84	13,41
	4.05.18	25	121,8	7,6	252,56	17,76

		34	167,6	10,5	98,24	11,1
	5.05.18	25	199	8,3	70,4	9,4
		34	225,2	15,6	36,96	6,8

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

Количество БГКП (КОЕ/г) сырья «Силос» в разведении  $1:10^6$  отражено в таблице 3.3.1.4.

Таблица 3.3.1.4

БГКП (КОЕ/г) сырья «Силос» в разведении  $1:10^6$

$A_1 = 32,6 / (0,000001 \times 0,1) = 32,6 \times 10^7$	$A_7 = 35,4 / (0,000001 \times 0,1) = 35,4 \times 10^7$
$A_2 = 54 / (0,000001 \times 0,1) = 54 \times 10^7$	$A_8 = 77,6 / (0,000001 \times 0,1) = 77,6 \times 10^7$
$A_3 = 90,8 / (0,000001 \times 0,1) = 90,8 \times 10^7$	$A_9 = 121,8 / (0,000001 \times 0,1) = 121,8 \times 10^7$
$A_4 = 147 / (0,000001 \times 0,1) = 147 \times 10^7$	$A_{10} = 167,6 / (0,000001 \times 0,1) = 167,6 \times 10^7$
$A_5 = 178 / (0,000001 \times 0,1) = 178 \times 10^7$	$A_{11} = 199 / (0,000001 \times 0,1) = 199 \times 10^7$
$A_6 = 203,4 / (0,000001 \times 0,1) = 203,4 \times 10^7$	$A_{12} = 225,2 / (0,000001 \times 0,1) = 225,2 \times 10^7$

### 3.3.2. Обработка цифровых данных разностным методом

Мы использовали результаты из крайнего разведения ( $1:10^6$ ) для обработки данных разностным методом. Таким образом, мы сравнивали данные по датам каждого типа сырья между собой. Достоверность различий определяли по критерию Стьюдента ( $p < 0,05$ ).

Обработка разностным методом данных, полученных при вычислении  
КМАиФАНМ (КОЕ/г), в разведении 1:10<sup>6</sup> на МПА, сырья «Силос» по дням  
инкубации при температуре 25<sup>0</sup>С

1 день инкубации		d	d-d <sub>cp</sub>	(d-d <sub>cp</sub> ) <sup>2</sup>	Sd (1-2)	Т <sub>фактич</sub> (1-2)
13.02.18	3.05.18					
20	6	14	15,2	231,04	17,53	0,07
53	0	53	54,2	2948,48		
11	13	-2	-0,8	0,64		
31	49	-18	-16,8	282,24		
4	57	-53	-51,8	2683,24		
X <sub>cp1</sub> =23,8	X <sub>cp2</sub> =25	d <sub>cp</sub> = -1,2	∑=0	∑(d-d <sub>cp</sub> ) <sup>2</sup> = 6148,64		
2 день инкубации		d	d-d <sub>cp</sub>	(d-d <sub>cp</sub> ) <sup>2</sup>	Sd (1-2)	Т <sub>фактич</sub> (1-2)
14.02.18	4.05.18					
45	98	-53	-22	484	15,7	1,97
71	110	-39	-8	68		
117	86	31	62	3844		
88	132	-44	-13	169		
94	144	-50	-19	361		
X <sub>cp1</sub> =83	X <sub>cp2</sub> =114	d <sub>cp</sub> = -31	∑=0	∑(d-d <sub>cp</sub> ) <sup>2</sup> = 4926		
3 день инкубации		d	d-d <sub>cp</sub>	(d-d <sub>cp</sub> ) <sup>2</sup>	Sd (1-2)	Т <sub>фактич</sub> (1-2)
15.02.18	5.05.18					
175	179	-4	36,2	1310,44	18,64	2,15
144	210	-66	-25,8	4356		
138	199	-61	-20,8	432,64		
193	208	-15	25,2	635,04		
170	225	-55	-14,8	219,04		
X <sub>cp1</sub> =164	X <sub>cp2</sub> =204,2	d <sub>cp</sub> = -40,2	∑=0	∑(d-d <sub>cp</sub> ) <sup>2</sup> = 6953,16		

Обработка разностным методом данных, полученных при вычислении КМАиФАНМ (КОЕ/г), в разведении 1:10<sup>6</sup> на МПА, сырья «Силос» по дням инкубации при температуре 34<sup>0</sup>С

1 день инкубации		d	d-d <sub>cp</sub>	(d-d <sub>cp</sub> ) <sup>2</sup>	Sd (1-2)	Т <sub>фактич</sub> (1-2)
13.02.18	3.05.18					
40	27	13	20,6	424,36	15,25	0,49
60	59	1	8,6	73,96		
58	27	31	38,6	1489,96		
34	89	-55	-47,4	2246,76		
60	88	-28	-20,4	416,16		
X <sub>cp1</sub> =50,4	X <sub>cp2</sub> =58	d <sub>cp</sub> =-7,6	∑=0	∑(d-d <sub>cp</sub> ) <sup>2</sup> =4651,2		
2 день инкубации		d	d-d <sub>cp</sub>	(d-d <sub>cp</sub> ) <sup>2</sup>		
14.02.18	4.05.18					
140	140	0	45	2025	13,29	3,38
108	182	-74	-29	841		
120	160	-40	5	25		
140	181	-41	4	16		
130	200	-70	-25	625		
X <sub>cp1</sub> =127,6	X <sub>cp2</sub> =172,6	d <sub>cp</sub> =-45	∑=0	∑(d-d <sub>cp</sub> ) <sup>2</sup> =3532		
3 день инкубации		d	d-d <sub>cp</sub>	(d-d <sub>cp</sub> ) <sup>2</sup>		
15.02.18	5.05.18					
200	205	-5	38,4	1474,56	14,05	3,08
160	253	-93	-49,6	2401		
186	227	-41	2,4	5,76		
202	237	-35	8,4	70,56		
205	248	-43	0,4	0,16		
X <sub>cp1</sub> =190,6	X <sub>cp1</sub> =234	d <sub>cp</sub> = -43,4	∑=0	∑(d-d <sub>cp</sub> ) <sup>2</sup> =3952,04		

Таблица 3.3.2.3

Обработка разностным методом данных, полученных при вычислении БГКП (КОЕ/г), в разведении 1:10<sup>6</sup> на МПА, сырья «Силос» по дням инкубации при температуре 25<sup>o</sup>С

1 день инкубации		d	d-d <sub>cp</sub>	(d-d <sub>cp</sub> ) <sup>2</sup>	Sd (1-2)	Т <sub>фактич</sub> (1-2)
13.02.18	3.05.18					
40	29	11	13,8	190,44	10,47	0,26
53	24	29	31,8	1011,24		
30	37	-7	-4,2	17,64		
17	48	-31	-28,2	795,24		
23	39	-16	-13,2	174,24		
X <sub>cp1</sub> =32,6	X <sub>cp1</sub> =35,4	d <sub>cp</sub> =-2,8	∑=0	∑(d-d <sub>cp</sub> ) <sup>2</sup> = 2188,8		
2 день инкубации		d	d-d <sub>cp</sub>	(d-d <sub>cp</sub> ) <sup>2</sup>	Sd (1-2)	Т <sub>фактич</sub> (1-2)
14.02.18	4.05.18					
74	101	-27	4	16	10,44	2,96
108	111	-3	28	784		
94	122	-28	3	9		
80	148	-68	-37	1369		
98	127	-29	2	4		
X <sub>cp1</sub> =90,8	X <sub>cp2</sub> =121,8	d <sub>cp</sub> = -31	∑=0	∑(d-d <sub>cp</sub> ) <sup>2</sup> = 2182		
3 день инкубации		d	d-d <sub>cp</sub>	(d-d <sub>cp</sub> ) <sup>2</sup>	Sd (1-2)	Т <sub>фактич</sub> (1-2)
15.02.18	5.05.18					
201	193	8	29	841	10,41	2,01
197	188	9	30	900		
153	212	-59	-38	1444		
167	204	-37	-16	256		
172	198	-26	-5	25		
X <sub>cp1</sub> =178	X <sub>cp2</sub> =199	d <sub>cp</sub> =-21	∑=0	∑(d-d <sub>cp</sub> ) <sup>2</sup> = 2166		

Таблица 3.3.2.4

Обработка разностным методом данных, полученных при вычислении БГКП (КОЕ/г), в разведении 1:10<sup>6</sup> на МПА, сырья «Силос» по дням инкубации при температуре 34<sup>0</sup>С

1 день инкубации		d	d-d <sub>cp</sub>	(d-d <sub>cp</sub> ) <sup>2</sup>	Sd (1-2)	Т <sub>фактич</sub> (1-2)
13.02.18	3.05.18					
60	85	-25	-1,4	1,96	9,06	2,60
67	57	10	33,6	1128,96		
37	81	-44	-20,4	416,16		
59	92	-33	-9,4	88,36		
47	73	-26	-2,4	5,76		
X <sub>cp1</sub> =54	X <sub>cp2</sub> =77,6	d <sub>cp</sub> = -23,6	∑=0	∑(d-d <sub>cp</sub> ) <sup>2</sup> = 1641,2		
2 день инкубации		d	d-d <sub>cp</sub>	(d-d <sub>cp</sub> ) <sup>2</sup>	Sd (1-2)	Т <sub>фактич</sub> (1-2)
14.02.18	4.05.18					
180	153	27	47,6	2265,76	18,06	1,14
170	163	7	27,6	761,76		
105	183	-78	-57,4	3294,76		
138	172	-34	-13,4	179,56		
142	167	-25	-4,4	19,36		
X <sub>cp1</sub> =147	X <sub>cp2</sub> =167,6	D <sub>cp</sub> =-20,6	∑=0	∑(d-d <sub>cp</sub> ) <sup>2</sup> = 6521,2		
3 день инкубации		d	d-d <sub>cp</sub>	(d-d <sub>cp</sub> ) <sup>2</sup>	Sd (1-2)	Т <sub>фактич</sub> (1-2)
15.02.18	5.05.18					
210	218	-8	13,8	190,44	6	3,63
205	221	-16	5,8	33,64		
200	235	-35	-13,2	174,24		
192	229	-37	-15,2	231,04		
210	223	-13	8,8	77,44		
X <sub>cp1</sub> =203,4	X <sub>cp2</sub> =225,2	d <sub>cp</sub> = -21,8	∑=0	∑(d-d <sub>cp</sub> ) <sup>2</sup> = 706,8		



Проанализировав полученные данные, и пользуясь правилом: если  $t_{\text{фактич}} \geq t_{\text{теоритич}}$ , можно с уверенностью сказать, что разность между вариантами существенна, что говорит о том, что при уровне вероятности  $P=0,95$ , между датами выборок разница – существенная. Количественный анализ бактериальной флоры выявил изменчивость общей численности клеток по сезонам года: максимум в пробе от 5.05.18 –  $234 \pm 19,1$  КОЕ/г силоса, а минимум 15.02.18 –  $190,6 \pm 18,6$  КОЕ/г.

### 3.4. Обработка данных полученных в ходе проведения ферментативной активности микроорганизмов

#### 3.4.1. Результаты проведения сахаролитической активности микроорганизмов

Таблица 3.4.1.1

Количественное определение сахаролитической активности микроорганизмов населяющих субстрат

Углевод	Оптическая плотность		
	До заражения	После заражения (инкубация 24 часа) среднее значение	
		<i>Serratia marcescens</i>	<i>Tatumella ptuseos</i>
Сахароза	0,21	0,19	0,19
Глюкоза	0,11	0,13	0,11
Лактоза	0,11	0,17	0,14
Фруктоза	0,16	0,53	0,17
Мальтоза	0,14	0,62	0,15
Контроль	0,8		

Качественный анализ сахаролитической активности микроорганизмов

Вид микроорганизмов	контроль	сахароза	глюкоза	лактоза	фруктоза	мальтоза
<i>Serratia marcescens</i>	-	-	*)	*)	К	К
<i>Tatumella pyseos</i>	-	-	-	*)	*)	*)

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



Рис. 3.4.1.1. Результат проведения реакции *Serratia marcescens* на сахаролитическую активность

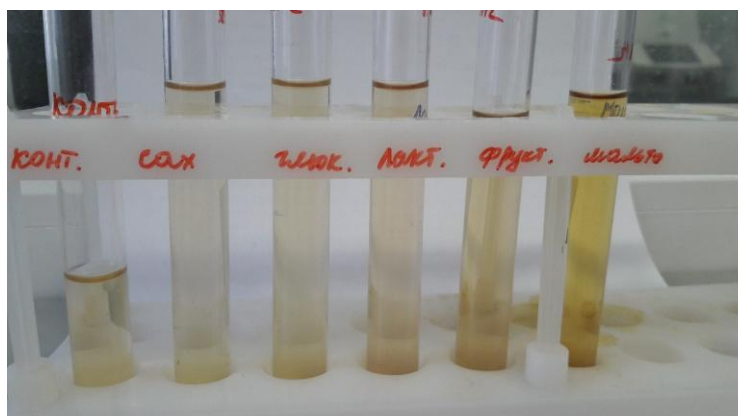


Рис. 3.4.1.2. Результат проведения реакции *Tatumella pyseos* на сахаролитическую активность

## 3.4.2. Результаты проведения протеолитической активности

Для обработки данных мы использовали результаты проведения опыта на протеолитическую активность микроорганизмов, взяв 0,1 мл разной концентрации определяемой оптической плотностью суспензии 0,5; 0,3; 0,1 мг/мл соответственно. Таким образом, мы сравнивали данные по активности каждой концентрации между собой, исследовав зависимость активности микроорганизмов от плотности суспензии.

Таблица 3.4.2.1

Вид микроорганизмов	Время культивирования	Количество суспензии, мл	Оптическая плотность		
			0,5	0,3	0,1
<i>Serratia marcescens</i>	24ч	0,1	1	1	1
<i>Tatumella tyseos</i>	24ч	0,1	1	1	1
<i>Serratia marcescens</i>	48ч	0,1	5	5	5
<i>Tatumella tyseos</i>	48ч	0,1	5	5	5

Качественное определение протеолитической активности микроорганизмов в зависимости от концентрации суспензии

Условные обозначения: «1» - отсутствие реакции; «2» -слабая реакция; «3»- средняя реакция; «4» - хорошая реакция; «5» -отличная реакция



Рис. 3.4.2.1. Молочный агар, до посева микроорганизмов (контроль)

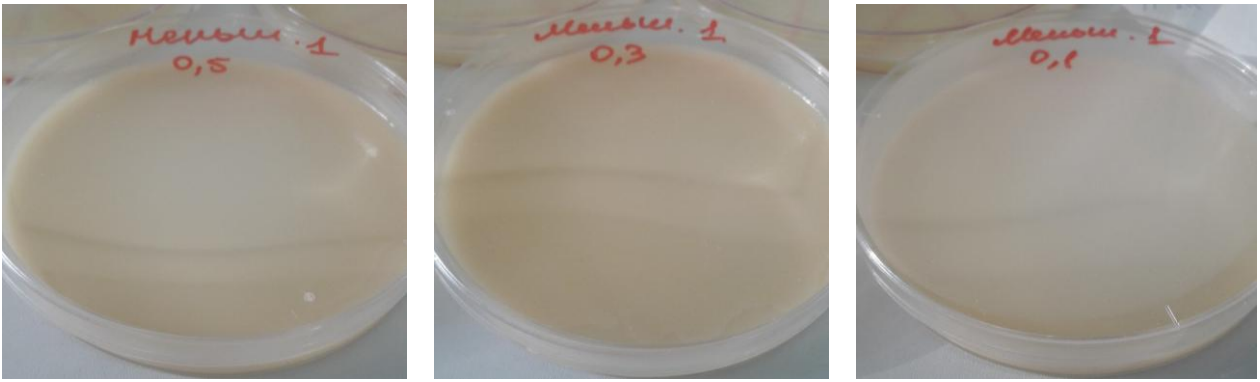


Рис.3.4.2.2. *Serratia marcescens* реакция на протеолитическую активность после 24 часов инкубации



Рис.3.4.2.3. *Tatumella ptuseos* реакция на протеолитическую активность после 24 часов инкубации

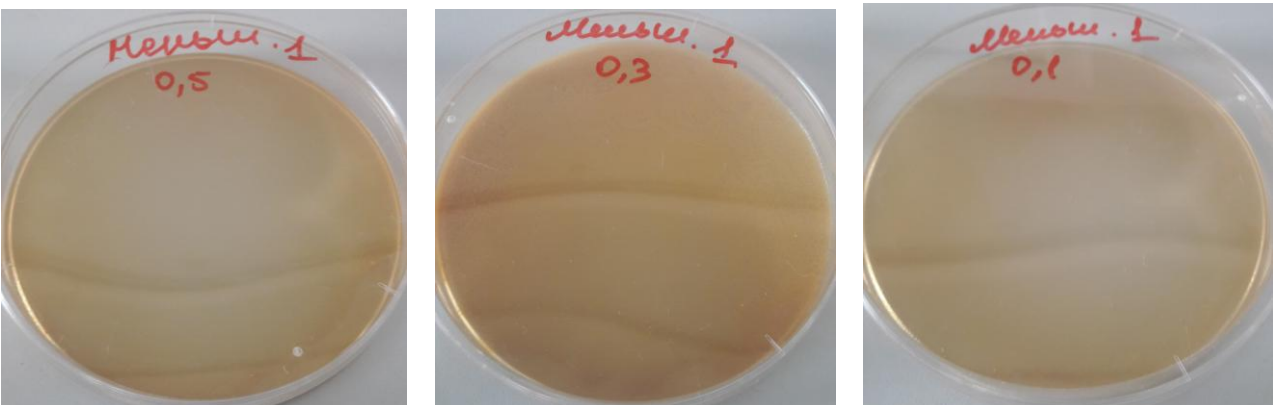


Рис.3.4.2.4. *Serratia marcescens* реакция на протеолитическую активность после 48 часов инкубации



Рис.3.4.2.5. *Tatumella tyseos* реакция на протеолитическую активность после 48 часов инкубации

В ходе исследования протеолитической активности штаммов *Tatumella tyseos* и *Serratia marcescens* определяли размер их колоний и клеток, которые представлены в таблицах 3.4.2.2 – 3.4.2.5.

Таблица 3.4.2.2

Размеры колоний штамма *Serratia marcescens*

Колония	Первое измерение, мм	Второе измерение, мм	Третье измерение, мм	Среднее значение, мм
1	0,6	0,6	0,5	0,56±0,02
2	0,2	0,2	0,2	0,2 ±0,0
3	0,1	0,1	0,1	0,1±0,0
4	0,1	0,1	0,1	0,1 ± 0,0
5	0,2	0,2	0,1	0,17 ± 0,02
6	0,2	0,2	0,2	0,2± 0,0
7	0,1	0,1	0,2	0,17 ± 0,02
8	0,2	0,2	0,3	0,23 ± 0,03
9	0,1	0,1	0,1	0,1 ± 0,0
10	0,1	0,1	0,1	0,1 ± 0,0
11	0,2	0,2	0,2	0,2± 0,0
12	0,3	0,3	0,3	0,3 ±0,0
13	0,1	0,1	0,1	0,1 ±0,0
14	0,4	0,3	0,4	0,33± 0,02
15	0,2	0,2	0,2	0,2± 0,0
16	0,3	0,3	0,3	0,3 ±0,0
17	0,2	0,2	0,1	0,17 ± 0,02
18	0,2	0,2	0,2	0,2± 0,0
19	0,2	0,2	0,2	0,2± 0,0

20	0,4	0,3	0,4	0,33± 0,02
Среднее значение колонии, мм	0,20 ± 0,02			

Таблица 3.4.2.3

Размеры колоний штамма *Tatumella ptuseos*

Колония	Первое измерение, мм	Второе измерение, мм	Третье измерение, мм	Среднее значение, мм
1	0,4	0,4	0,4	0,4±0,0
2	0,3	0,3	0,3	0,3 ±0,0
3	0,3	0,3	0,4	0,33±0,03
4	0,5	0,5	0,5	0,5 ± 0,0
5	0,5	0,5	0,4	0,67 ± 0,03
6	0,4	0,4	0,4	0,4± 0,0
7	0,5	0,5	0,5	0,5 ± 0,0
8	0,3	0,3	0,3	0,3± 0,0
9	0,4	0,4	0,4	0,4 ± 0,0
10	0,2	0,2	0,3	0,23 ± 0,03
11	0,2	0,2	0,2	0,2± 0,0
12	0,3	0,3	0,3	0,3 ±0,0
13	0,5	0,5	0,5	0,5 ±0,0
14	0,4	0,4	0,4	0,4± 0,0
15	0,3	0,3	0,3	0,3± 0,0
16	0,4	0,3	0,4	0,33± 0,02
17	0,5	0,5	0,4	0,67 ± 0,03
18	0,4	0,4	0,4	0,4± 0,0
19	0,5	0,5	0,5	0,5 ± 0,0
20	0,5	0,5	0,4	0,67 ± 0,03
Среднее значение колонии, мм	0,415 ± 0,03			

Размеры микроорганизмов штамма *Serratia marcescens*

Микроорганизм	Первое измерение, мкм	Второе измерение, мкм	Третье измерение, мкм	Среднее значение, мкм
1	0,6/ 1,2	0,6/ 1,2	0,6/ 1,2	0,6±0,0/ 1,2±0,0
2	0,7/ 1,3	0,7/ 1,3	0,6/ 1,3	0,67 ±0,03/ 1,3±0,0
3	0,6/ 1,7	0,6/ 1,6	0,6/ 1,7	0,6±0,0/ 1,67±0,03
4	0,6/ 1,7	0,7/ 1,7	0,7/ 1,7	0,67 ± 0,08/ 1,7±0,0
5	0,8/ 1,7	0,8/ 1,7	0,8/ 1,7	0,8 ± 0,02/ 1,7±0,0
6	0,5/ 1,8	0,5/ 1,8	0,5/ 1,8	0,5± 0,0 / 1,8± 0,0
7	0,7/ 1,3	0,7/ 1,3	0,7/ 1,2	0,7 ± 0,0/ 1,267± 0,02
8	0,8/ 1,9	0,8/ 1,9	0,8/ 1,9	0,8 ± 0,0/ 1,9± 0,0
9	0,5/ 1,8	0,5/ 1,8	0,5/ 1,8	0,5± 0,0 / 1,8± 0,0
10	0,6/ 1,7	0,6/ 1,6	0,6/ 1,7	0,6±0,0/ 1,67±0,03
11	0,7/ 1,3	0,7/ 1,3	0,6/ 1,3	0,67 ±0,03/ 1,3±0,0
12	0,9/ 1,7	0,9/ 1,7	0,8/ 1,7	0,867 ±0,02/ 1,7±0,0
13	0,6/ 1,9	0,6/ 1,9	0,6/ 1,9	0,6 ±0,0/ 1,9±0,0
14	0,5/ 1,8	0,5/ 1,8	0,5/ 1,8	0,5± 0,0 / 1,8± 0,0
15	0,6/ 1,7	0,7/ 1,7	0,7/ 1,7	0,67 ± 0,08/ 1,7±0,0
16	0,7/ 1,3	0,7/ 1,3	0,6/ 1,3	0,67 ±0,03/ 1,3±0,0
17	0,6/1,2	0,6/1,2	0,6/1,2	0,6±0,0/ 1,2±0,0
18	0,6/ 1,7	0,6/ 1,6	0,6/ 1,7	0,6±0,0/ 1,67±0,03
19	0,6/ 1,7	0,6/ 1,6	0,6/ 1,7	0,6±0,0/ 1,67±0,03
20	0,7/	0,7/	0,6/	0,67 ±0,03/

	1,3	1,3	1,3	1,3±0,0
Среднее значение размера микроорганизмов, мкм	0,68 ± 0,03/ 1,5			

Таблица 3.4.2.5

Размеры микроорганизмов штамма *Tatumella ptyseos*

Микроорганизм	Первое измерение, мкм	Второе измерение, мкм	Третье измерение, мкм	Среднее значение, мкм
1	0,8/ 1,9	0,8/ 1,9	0,8/ 2,0	0,8±0,0/ 1,93±0,03
2	1,1 / 2,8	1,1/ 2,8	1,1/ 2,8	1,1 ±0,0/ 2,8±0,0
3	0,9/ 2,1	0,9/ 2,1	1,0/ 2,1	0,933±0,03/ 2,1±0,0
4	0,8/ 2,7	0,8/ 2,7	0,8/ 2,7	0,8 ± 0,0/ 2,7±0,0
5	0,6/ 2,4	0,6/ 2,4	0,6/ 2,4	0,8 ± 0,0/ 2,4±0,0
6	0,5/ 2,7	0,5/ 2,7	0,5/ 2,7	0,5± 0,0 / 2,7± 0,0
7	0,4/ 2,8	0,4/ 2,8	0,4/ 2,8	0,4 ± 0,0/ 2,8± 0,02
8	0,8/ 2,6	0,8/ 2,6	0,7/ 2,6	0,767 ± 0,03/ 2,6± 0,0
9	0,7/ 2,9	0,7/ 2,9	0,7/ 2,9	0,5± 0,0 / 2,9± 0,0
10	0,3/ 2,8	0,3/ 2,8	0,3/ 2,9	0,3±0,0/ 2,767±0,03
11	0,7/ 2,5	0,7/ 2,5	0,6/ 2,5	0,67 ±0,03/ 2,5±0,0
12	0,8/ 2,6	0,8/ 2,6	0,7/ 2,6	0,767 ± 0,03/ 2,6± 0,0
13	1,1 / 2,8	1,1/ 2,8	1,1/ 2,8	1,1 ±0,0/ 2,8±0,0
14	0,8/ 1,9	0,8/ 1,9	0,8/ 2,0	0,8±0,0/ 1,93±0,03
15	0,3/ 2,8	0,3/ 2,8	0,3/ 2,9	0,3±0,0/ 2,767±0,03
16	0,7/ 2,9	0,7/ 2,9	0,7/ 2,9	0,5± 0,0 / 2,9± 0,0



	2,9	2,9	2,9	2,9± 0,0
17	0,8/ 2,7	0,8/ 2,7	0,8/ 2,7	0,8 ± 0,0/ 2,7±0,0
18	0,9/ 2,1	0,9/ 2,1	1,0/ 2,1	0,933±0,03/ 2,1±0,0
19	0,8/ 2,7	0,8/ 2,7	0,8/ 2,7	0,8 ± 0,0/ 2,7±0,0
20	0,8/ 2,7	0,8/ 2,7	0,8/ 2,7	0,8 ± 0,0/ 2,7±0,0
Среднее значение размера микроорганизмов, мкм	0,713± 0,136/ 2,57±0,07			

Как видно из рисунков 3.4.2.1 – 3.4.2.5 и таблицы 3.4.2.1, после посева на молочный агар выделенные штаммы *Tatumella ptuseos* и *Serratia marcescens* проявляют протеолитическую активность спустя 48 часов инкубации при температуре 34°C. Это означает, что происходит потребление казеина данными штаммами.

### 3.4.3. Результаты проведения каталазной активности

Для обработки данных использовались результаты, проведения эксперимента на наличие каталазной активности в реакции исследуемых нами видов микроорганизмов *Serratia marcescens* и *Tatumella ptuseos* с различными концентрациями H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Таблица 3.4.3.1

#### Качественный анализ каталазной активности

Виды микроорганизмов	Концентрация H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	
	1%	0,5%
<i>Serratia marcescens</i>	Бурная	Средняя
<i>Tatumella ptuseos</i>	Средняя	Слабая

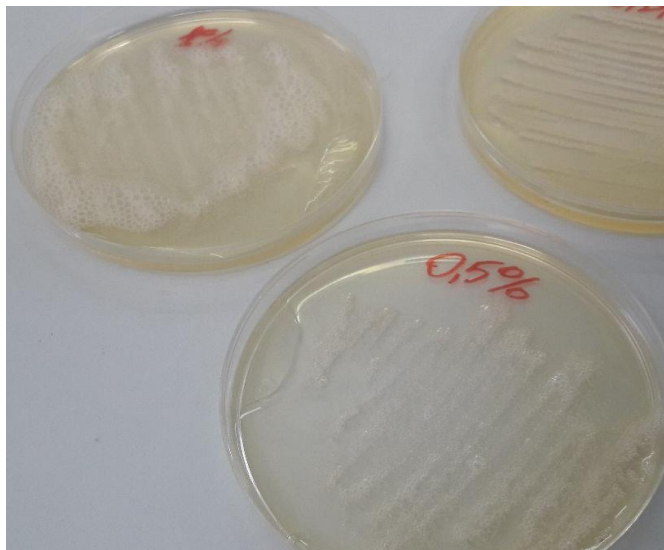


Рис.3.4.3.1. *Serratia marcescens* реакция на каталазную активность

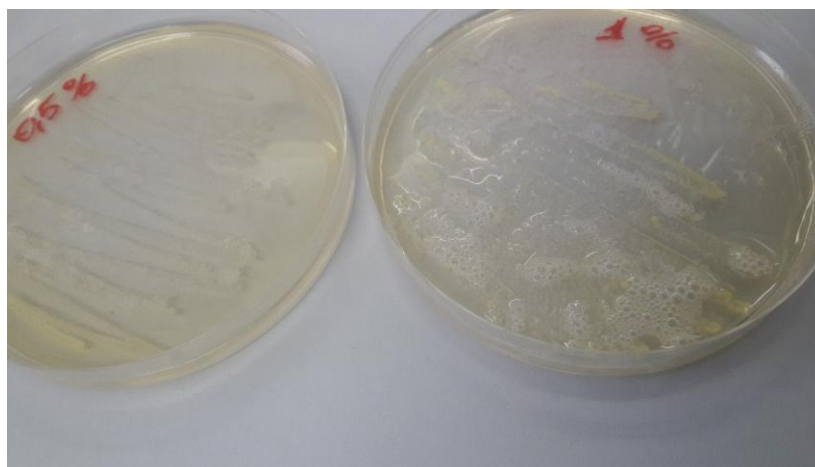


Рис.3.4.3.2. *Tatumella tyseos* реакция на каталазную активность

## Количественный анализ каталазной активности

Виды микроорганизмов	Количество выделенных пузырей газа	
	1%	0,5%
<i>Serratia marcescens</i>	$5 \cdot 10^4$	$2,5 \cdot 10^3$
<i>Tatumella tyseos</i>	$2,5 \cdot 10^3$	$5 \cdot 10^2$

Как видно из таблиц 3.4.3.1 и 3.4.3.2 при добавлении 1%-ного раствора перекиси водорода микроорганизмы вида *Serratia marcescens* проявляют бурную каталазную реакцию, а при использовании 0,5%-ного раствора перекиси водорода – среднюю. При добавлении 1%-ного раствора перекиси водорода микроорганизмы вида *Tatumella tyseos* проявляют среднюю реакцию, а при использовании 0,5%-ного раствора перекиси водорода – слабую.

Наблюдаемая химическая реакция с выделением молекулярного кислорода говорит о наличии фермента каталазы, расщепляющей молекулы  $H_2O_2$ , в клетках изучаемых штаммов и проявлении у них каталазной активности.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Производство биогаза является одним из самых экономически выгодных и экологически безопасных способов переработки органических отходов растениеводства и животноводства. Биогаз представляет собой продукт микробиологического разложения, которое состоит из нескольких стадий, каждая из которых происходит под влиянием определенной микрофлоры [56].

Биогазовые установки позволяют получить не только биогаз, но и целый спектр важных для человека продуктов, таких как тепло от сжигания биогаза, электричество и биоудобрения, получаемые при переработке биомассы, что доказывает необходимость разработки методов повышения эффективности биогазовой отрасли и оптимизации микробных сообществ, участвующих в производстве биогаза [14].

Полученные результаты исследования, представленные в данной работе, позволяют сделать следующие выводы:

1. Пробоотбор сырья (силос) биогазовой установки ООО «Альтэнерго» позволил исследовать микрофлору данного сырья путем посева на чашки Петри и определить находящиеся в сырье микроорганизмы до вида;

2. Количественный анализ бактериальной флоры выявил изменчивость общей численности клеток по сезонам года: максимум в пробе от 5.05.18 –  $234 \pm 19,1$  КОЕ/г силоса, а минимум 15.02.18 –  $190,6 \pm 18,6$  КОЕ/г. что объясняется , погодными условиями, которые влияют на активность микроорганизмов, а так же моментом подкормки микроорганизмов.

3. Качественный анализ микрофлоры сырья показал достаточно широкое разнообразие бактерий, включающее роды: *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Tatumella* и *Serratia*.

4. Исследования по сахаролитической активности вида *Serratia marcescens* показали, что этот вид микроорганизмов имеет слабую активность в

присутствии глюкозы и лактозы, в присутствии фруктозы и мальтозы – образуют кислоты; исследования по сахаролитической активности вида *Tatumella ptuseos* показали, что этот вид микроорганизмов имеют слабую активность в присутствии в среде лактозы, фруктозы и мальтозы.

5. После посева на молочный агар выделенные штаммы *Tatumella ptuseos* и *Serratia marcescens* проявляют протеолитическую активность спустя 48 часов инкубации при температуре 34°C. Это означает, что происходит потребление казеина данными штаммами.

6. Исследования по каталазной активности показали, что при добавлении 1%-ного раствора перекиси водорода микроорганизмы вида *Serratia marcescens* проявляют бурную каталазную реакцию, а при использовании 0,5%-ного раствора перекиси водорода – среднюю. При добавлении 1%-ного раствора перекиси водорода микроорганизмы вида *Tatumella ptuseos* проявляют среднюю реакцию, а при использовании 0,5%-ного раствора перекиси водорода – слабую.

Наблюдаемая химическая реакция с выделением молекулярного кислорода говорит о наличии фермента каталазы, расщепляющей молекулы  $H_2O_2$ , в клетках изучаемых штаммов и проявлении у них каталазной активности.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Интернет-ресурс: <http://ru.wikipedia.org/wiki/Биогаз>
2. Интернет ресурс: <http://biogaz-russia.ru>
3. Интернет ресурс: <http://tweetbot.ru/biotehnologiya-spirta/545-anaerobnyy-sposob-polucheniya-udobreniyachast-4.html>
4. Интернет ресурс: <http://altenergetics.ru/bioenergetika/264-proektirovanie-biogazovykh-ustanovok?start=3>
5. Интернет ресурс: <http://sibac.info/index.php/2009-07-01-10-21-16/5486-2012-12-19-08-57-04>
6. Андреева, Р.А. Физико-химические основы КПОО в энергоносители /Р. А. Андреева. – М.: LAP Lambert Academic Publishing, 2013. – 296 с.
7. Антипов, С.А. Биогаз /С.А. Антипов // Сборник трудов победителей конкурса научно-исследовательских работ студентов и аспирантов ВГТУ по приоритетным направлениям развития науки и технологий «Научная опора воронежской области». –2017. – С. 17-18.
8. Баадер, В. Биогаз: теория и практика / В. Баадер. – М: Колос, 2011. – 125 с.
9. Баран, А.Н. Биогазовые установки как средство улучшения экологии и получения энергии / А.Н. Баран, Е.А. Семенихина // Энергосбережение – важнейшее условие инновационного развития АПК: материалы Междунар. науч.-технич. конф., Минск, 23–24 октября 2009 г.: в 2 ч. / Мин-во сельск. хоз-ва и продовольст-вия Республики Беларусь, Белорус. гос. аграрный тех. ун-т. – Минск, 2009. – Ч. 1. – С. 80–81.
10. Биркин, С. Применение биогазовых технологий для утилизации отходов животноводства / С. Биркин. – М.: LAP Lambert Academic Publishing, 2011. – 164 с.
11. Бобылев, С.Л. Биогаз – топливо будущего / С.Л. Бобылев, А.В. Пермяков // Сборник научных трудов V-й ежегодной научно-практической конференции «Университетская наука - региону» Молодая наука-2017 –. 2017. – С. 35-37.

12. Васильева, И.С. Альтернативный энергоноситель – биогаз / И.С. Васильева, С.В. Баканова // Уральский научный вестник. –2018. – Т. 1. № - 2 (167). – С. 59-61.
13. Глебова, Н.С. Биогаз как альтернативный источник энергии / Н.С. Глебова // Материалы Международной (заочной) научно-практической конференции «Теоретические и практические аспекты развития современной науки». – 2017. – С. 43-46.
14. Грицина, В.Г. Влияние органического биоудобрения КРС (эффлюента) на урожайность кукурузы на силос в Белгородской области / В.Г. Грицина // Молодежь и инновации – 2011: материалы Междунар. науч.-практ. конф. молодых ученых, Горки, 25–27 мая 2011г. / Белорус. гос. сельс.-хоз. Академия; редкол.: Курдеко А.П. [и др.]. – Горки, 2011. – Ч.1. – С. 148–150.
15. Гудкова, Л.К. Получение органических удобрений путем анаэробно- го сбраживания отходов сельскохозяйственного производства / Л.К. Гудкова, В.Ф. Пуляев, Т.В. Старченко // Аграрная энергетика в XXI столетии: материалы 3-й Междунар. научно-технич. конф., Минск, 21–23 ноября 2005 г. / НАН Беларуси, Ин-т энергетики АПК НАН Беларуси; редкол.: В.И. Русан. – Минск, 2005. – С. 255–258.
16. Дичко, А.О. Анализ методов повышения производительности анаэробной переработки биомассы в биогаз / А.О. Дичко, И.О. Ополинский // Theoretical & Applied Science. – 2017. – № 5 (49). – С. 211-216.
17. Емельянова, Е.А. Биогаз / Е.А. Емельянова, С.Б. Зырянов // Молодежь и наука. – 2016. – №6. – С. 50.
18. Закумбаева, Г. Каталитические превращения газообразных углеводородов / Г. Закумбаева, Ш.Иткулова. – М.: LAP Lambert Academic Publishing, 2013. – 384 с.
19. Земсков, В.И. Проектирование ресурсосберегающих технологий и технических систем в животноводстве. Учебное пособие / В.И. Земсков. – СПб. : Лань, 2016. – 384 с.

20. Зимоглядова, Т.В. Практикум по микробиологии: Учеб. Пособие / Т.В. Зимоглядова, И.А. Карташова, О.Г. Шабалдас. – М.: Колос; Ставрополь: АГРУС, 2007. – 148 с.
21. Кашкаров, А.П. Современные био-, бензо-, и дизель- генераторы и другие полезные конструкции / А.П. Кашкаров. – М.: ДМК Пресс, 2011. – 142 с.
22. Килин, А.В. Биогаз как альтернативный источник энергии / А.В. Килин, А.Я. Щукина // Материалы VII Международной молодежной научной конференции «Молодежь и XXI век- 2017 » . – 2017. –С. 126-129.
23. Ковалев, А. Отопление административного здания от индивидуального котла на биогазе / А. Ковалев. – М.: LAP Lambert Academic Publishing, 2013. – 92 с.
24. Костарев, С. Системный анализ управления отходами / С. Костарев, Т. Серeda, М. Михайлова. – М.: LAP Lambert Academic Publishing, 2012. – 360 с.
25. Костромин, Д.В. Анаэробная переработка органических отходов животноводства в биореакторе с барботажным перемешиванием: автореф. ... канд. тех. наук / Д.В. Костромин. – М., 2010. – 17 с.
26. Малофеев, В.М. Биотехнология и охрана окружающей среды: Учебное пособие/ В.М. Малофеев. – М.: Издательство Арктос, 2011. – 188 с.
27. Мастепанов, А.М. Нетрадиционный газ как фактор регионализации газовых рынков / А.М. Мастепанов, А.Д. Степанов, С.В. Горевалов, А.М. Белогорьев. – М.: Энергия, 2013. – 128 с.
28. Матмуродов Ф. Рабочие органы агропромышленных машин. Второй том/ Ф. Матмуродов. – М.: LAP Lambert Academic Publishing, 2014. – 684 с.
29. Матмуродов, Ф. Рабочие органы агропромышленных машин. Первый том / Ф. Матмуродов. – М.: LAP Lambert Academic Publishing, 2014. – 692 с.
30. Микробиология биогазовых производств / Настольная книга ООО «Альт Энерго», 2012. – 22 с.



31. 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.
32. Некрасов, В. Микробиологическая анаэробная конверсия биомассы / В. Некрасов, А. Веденев, Т. Веденева. – М.: LAP Lambert Academic Publishing, 2014. – 688 с.
33. Несмелова, Н.Н. Многомерные методы исследования биологических систем / Н.Н. Несмелова, Е.Г. Незнамова, Г.В. Смирнов. - Томск: ТУСУР, 2007. – 178 с.
34. Никитина, Е.П. Коллекция определений термина «статистика» / Е.П. Никитина, В.Д. Фрейдлина, А.В. Ярхо. – М.: МГУ, 1972. – 236 с.
35. Панцхава, Е.С. Биоэнергетика. Мир и Россия. Биогаз. Теория и практика. Монография / Е.С. Панцхава. – М.: , 2015. – 976 с.
36. Пачурин Г. Экологические аспекты биоэнергетики / Г. Пачурин, О. Маслеева, Е. Соснина. – М.: LAP Lambert Academic Publishing, 2012. – 92 с.
37. Рагозина, М.В. Технологические особенности переработки фуззы в биогаз / М.В. Рагозина, И.В. Мирошниченко // Материалы международной студенческой научной конференции «Молодёжный аграрный форум - 2018». – 2018. – С. 267.
38. Самосюк, В.Г. Биогазовые технологии в Беларуси: состояние и перспективы / В.Г. Самосюк, Н.Ф. Капустин, А.Н. Басаревский // Мех-ция и электризация сельск. хоз-ва: межведомст. тематич. сб. / НАН Беларуси, Научно-практич.центр НАН Беларуси по мех-ции сельск. хоз-ва. – Минск, 2011. – Вып. 45. – С. 234– 240.
39. Санжаровская, М.И. Анаэробная переработка отходов для получения биогаза / М.И. Санжаровская // Реферативный журнал. – 2009. –№ 2. – С. 381.
40. Санжаровская, М.И. Газ и удобрения из биоотходов / М.И. Санжаровская // Реферативный журнал. –2008. – №3. – 650 с.
41. 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.
42. Сидыганов, Ю.Н. Интенсивная технология производства биогаза: монография / Ю.Н. Сидыганов, Д.В. Костромин. – Йошкар-Ола: ПГТУ, 2013. – 331 с.
43. Сиротин, А.А. Практикум по микробиологии/ А.А. Сиротин.- Белгород. 2007. – 78 с.
44. Скорик, Ю.И. Отходы большого города: как их собирают удаляют и перерабатывают / Ю.И. Скорик, Т.М. Флоринская А.С. Баев. – СПб, 1998. – 147 с.
45. Слюсаренко, Т.П. Лабораторный практикум по микробиологии пищевых производств / Т.П. Слюсаренко. – М.: Лег. и пищ. пром-сть, 1984. – 208 с.
46. Соуфер, С. Биомасса как источник энергии / С. Соуфер, О. Заборски. – М.: Мир, 1985. – 368 с.
47. Стребков, Д.С. Биогазовые установки для обработки отходов животноводства / Д.С. Стребков, А.А. Ковалев // Техника и оборудование для села. – 2006. – №11. – С. 25-32.
48. Стребков, Д.С. Биогазовые установки для обработки отходов животноводства / Д.С. Стребков, А.А. Ковалев // Техника и оборудование для села. – 2006. – №11.– С. 28 –30.
49. Тихонравов, В.С. Ресурсосберегающие биотехнологии производства альтернативных видов топлива в животноводстве / В.С. Тихонравов. Научно-аналитический обзор. – М.: ФГБНУ «Росинформагротех», 2011. – 52 с.
50. Харламова, М.Д. Экологически чистые технологии и производства. Теория и практика / М.Д. Харламова, В.П. Зволинский, Д.А. Кривошеин. – М.: Издательство Российского Университета дружбы народов, 2007. – 96 с.
51. Хоулт, Дж. Определитель бактерий Берджив 2-х т. Т.1 / Дж. Хоулт, Н. Криг, П. Снит, Дж. Стейли, С. Уильямс. – Москва: Мир, 1997. – 432 с.В.И.

- Земсков. Возобновляемые источники энергии в АПК. Учебное пособие. – СПб.: Лань, 2014. – 368 с.
52. Черкес, Ф.К. Микробиология / Ф.К. Черкес. – М.: издательство «Медицина», 2012. – 315 с.
53. Четошникова, Л.М. Нетрадиционные возобновляемые источники энергии: учебное пособие / Л.М. Четошникова. – Челябинск: Изд-во ЮУрГУ, 2010. – 189 с.
54. Швец, В.Ф. Введение в химию каталитических реакций / В.Ф. Швец. – М.: Российский химико-технологический университет имени Д. И. Менделеева. – 1996. – 148 с.
55. Шомин, А. А. Биогаз на сельском подворье / А.А. Шомин. — Балаклея: Информационно-издательская компания "Балаклійщина", 2010. – 72 с.
56. Щукина, А.Я. Биогаз как альтернативный источник энергии /А.Я. Щукина, Д.В. Бурундукова // Сборник XV Международной научно-практической конференции «Татищевские чтения: актуальные проблемы науки и практики». – 2018. –С. 186-196.
57. Bohn, I. Björnsson, L, Mathiasson B. The energy balance in farm scale anaerobic digestion of crop residues at 11-37°C / I. Bohn, L. Björnsson, B. Mathiasson // Process Biochemistry. – 2006. – №42. – P. 57-64.
58. Chen, Y. Inhibition of anaerobic digestion process: A review. / Y. Chen, J.J. Cheng, K.S. Creamer//Bioresource Technology. – 2008. –№ 99. – P. 4044-4064.
59. Cirne, D.G. Hydrol-ysis and microbial community analysis in two-stage anaerobic digestion of energy crops. / D.G. Cirne, A. Lehtomäki, L. Björnsson, L.L. Blackhall //Journal of Applied Microbiology. – 2008. –№ 103. – P. 516-527.
60. Climehaga, M. A. and Banks, C. J. (2008). Anaerobic digestion of catering wastes: effect of micronutrients and retention time /M.A. Climehaga, C.J. Banks// Water Science and Technology. – 2008. –№ 57. – P. 698-692.
61. Colberg, P.J. Anaerobic microbial degradation of cellulose, lignin, oligolignols, and monoaromatic lignin derivates / P.J. Colberg // Biology of Anaerobic. – 1988. – P. 333-372.
62. Collins, G. New low temperature applications of an-aerobic wastewater treatment / G. Collins, S. McHugh, S. Connaughton, A.M. Enrich, A. Kearney, T. Mahony, P.Madden, V. O’Flaherty // Journal of Environmental Science and

- Health Part A - Toxic and Hazardous Substances and Environmental Engineering. – 2006. – № 41. – P. 881-895.
63. Dalidenok, A.D. BIOGAS AS AN ALTERNATIVE ENERGY SOURCE / A.D. Dalidenok // Сборник научных трудов XVII Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы экологии и природопользования». – 2015. – С. 44-46.
64. Dasonville, F. Interactions between microbial processes and geochemical transformations under anaerobic conditions: a review / F. Dasonville, P. Renault // *Agronomie*. – 2002. – №22. – P.51-68.
65. Ding, S.Y. A biophysical perspective on the cellulosome: new perspective for biomass conversion / S.Y. Ding, Q. Xu, M. Crowley, Y. Zeng, M. Nimlos, R. Lamed, E.A. Bayer, M.E. Himmel // *Current Opinion in Biotechnology*. – 2008. – №19. – P. 218-227.
66. Doi, R.H. Cellulases of mesophilic microorganisms / R.H. Doi // *Annual New York Academy of Sciences*. – 2008. – №1125. – P. 267-279.
67. Dolfing, J. Acetogenic dehydrogenations / J. Dolfing // *Biology of Anaerobic Micro-organisms* (Zehnder. J.B. ed) John Wiley and Sons, Inc. – 1988. – P. 417-468.
68. Drake, H.L. Old acetogens, new light / H.L. Drake, A. Gössner, S. Daniel // *Annual New York Academy of Sciences*. – 2008. – №1125. – P. 100-128.
69. Florencio, L. Effect of cobalt on the anaerobic degradation of methanol / L. Florencio, P. Jenicek, J.A. Field, G. Lettinga // *Journal of Fermentation and Bioengineering*. – 1993. – № 75. – P. 368-374.
70. Marchain, U. Biogas process for sustainable development. In: *FAO Agricultural Service Bulletin 9–5. Food and Agricultural Organization* / U. Marchain. – Rome, Italy. – 1992. 25.
71. Rivard, C.J. Anaerobic digestion of municipal solid waste. Utility of process residues as a soil amendment / C.J. Rivard // *Rivard Appl. Biochem. Biotech.* – 1995. – № 51. – P.125–135.
72. Schievano, A. What is digestate? / A. Schievano // *Anaerobic Digestion: Opportunities for Agriculture and Environment*, Milano, January 24–25, 2008 / Regione Lombardia, Università Degli studi di Milano: Ed. by F. Adani, A. Schievano, G. Bossalio. – Italy, 2009. – P. 7–18.

73. Svensson, K. The fertilizing effect of compost and biogas residues from source separated household waste / K. Svensson, M. Odlare, M. Pell // J. Agric. Sci. – 2004. – № 142. – P. 461–467