

АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного

На правах рукопису

КУРДИШ Іван Кирилович

ФІЗІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ МЕТАНОТРОФНИХ БАКТЕРІЙ
І ЗАКОНОМІРНОСТІ ЇХ ФУНКЦІОНУВАННЯ У БУГІЛЬНИХ ШАХТАХ

03.00.07. - мікробіологія

03.00.23. - біотехнологія

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т
дисертації на здобуття наукового ступеня
доктора біологічних наук

Київ-1993



Робота виконана в лабораторії мікробіологічних процесів
на твердих поверхнях Інституту мікробіології і вірусології
ім. Д. К. Заболотного АН України

Офіційні опоненти:

доктор медичних наук Л. І. Глоба
доктор біологічних наук В. М. Іванов
доктор технічних наук, член-кореспондент Академії
технологічних наук України, професор В. О. Маринченко

Провідна організація: Кафедра мікробіології
Дніпропетровського державного університету.

Захист дисертації відбудеться 15 грудня 1993 року
о 10⁰⁰ на засіданні Спеціалізованої ради Д. 016. 06. 01
при Інституті мікробіології і вірусології
ім. Д. К. Заболотного АН України за адресою:
252143, Київ-143, вул. Заболотного, 154

З дисертацією можна ознайомитись в бібліотеці
Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного
АН України

Автореферат розісланий 15 листопада 1993 року

Учений секретар
спеціалізованої ради *Гурман* Л. М. Пуриш

Актуальність проблеми. Метанотрофні бактерії є частиною мікробного світу, яка спеціалізувалась на споживанні метану і метанолу як джерел вуглецю та енергії. Інтерес до цієї групи мікроорганізмів в значній мірі обумовлений рядом фізіологічних, біохімічних та інших особливостей, а також їх значним біотехнологічним потенціалом.

Метанотрофним бактеріям належить важлива роль в кругообігу вуглецю в біосфері (Малашенко в співавт., 1978; Seiler, 1984; Гальченко, 1989). Ці мікроорганізми знаходять застосування в процесі біосинтезу мікробного білку (Айкарян, Котов, 1988; Плясов, 1988), можуть використовуватись для одержання ряду метаболітів (Hou et al., 1979; Малашенко в співавт., 1985; Proenca, Collaco, 1987; Гаязов в співавт., 1990; Пинуев, 1992; Бабусенко в співавт., 1992), в процесах трансформації деяких хімічних сполук (Mountfort et al., 1990), а також для детоксикації деяких галогенпохідних вуглеводнів (Janssen et al., 1988; Hanson et al., 1991; Park et al., 1992).

Перспективним вбачається застосування метанотрофних бактерій у вугільних шахтах для зниження в них концентрації метану. Як відомо, при видобуванні вугілля на більшості шахт Донбасу відбувається інтенсивне виділення метану в лаву забою та гірничі виробки-понад 15 м^3 на тону вугілля (Петросян, 1975). Таким чином, при середньодобовому видобутку вугілля близько 660 т (Зубков, 1989), в гірничі виробки надійде близько 10 000 кубометрів метану, що може призвести до утворення в них вибухонебезпечних газових сумішей (Айруні, 1970).

Найбільш ефективним методом боротьби з метаном у вугільних шахтах є їх провітрювання. Однак цей підхід часто не дає бажаних результатів (Айруні, 1970). В таких випадках, поряд з провітрюванням гірничих виробок, застосовують інші методи: вакуумну дегазацию вугільних пластів, ізолювання метану в порак вугілля шляхом нагнітання у вугільні пласти води чи розчинів, які здатні полімеризуватися (Москаленко, 1971, а; Морозов, Тарасенко, 1972). Однак ці методи також часто не дають бажаних наслідків.

Певного зниження виділення метану в гірничі виробки можна досягти шляхом його окислення метанотрофними бактеріями безпосередньо у вугільному пласті (Москаленко, 1971; Сусленков, 1976;

Нестеров, 1983). Однак такий підхід має ряд технологічних складностей, основними з яких є необхідність нагнітання у вугільний пласт суспензії мікроорганізмів та забезпечення її киснем (Курдиш з співавт., 1982).

Враховуючи те, що основна кількість метану поступає в лаву в вироблених просторах-пустот, які утворюються в гірському масиві в результаті видобутку вугілля (М'якенький з співавт., 1983; Ушаков, Шагова, 1985), нами запропонований метод зниження виділення метану з цих зон шляхом його окислення іммобілізованими метанотрофними бактеріями (Курдиш з співавт., 1980).

Ефективність цього методу, а також можливість реалізації біотехнологічного потенціалу метанотрофних бактерій в інших сферах народного господарства визначається рівнем дослідження біології цих мікроорганізмів. В зв'язку з недостатньою науковою розробкою багатьох питань, які стосуються життєдіяльності даних бактерій, їх функціонування у вугільних шахтах, можливість управління процесом бактеріального окислення метану у вироблених просторах цих шахт є обмеженою. Все це свідчить про актуальність подібних досліджень.

Мета та завдання досліджень. Мета дисертаційної роботи полягала в розробці фізіологічних основ управління процесом бактеріального окислення метану у вироблених просторах вугільних шахт.

В роботі вирішувались такі завдання:

-вивчити особливості поширення метанотрофних бактерій у вугільних шахтах, умови функціонування цих мікроорганізмів у шахтних водах, визначити роль метанотрофної мікрофлори шахтних вод у формуванні метановмісної атмосфери гірничих виробок, а також оцінити можливість використання даних вод як основи для приготування живильних середовищ, необхідних при мікробіологічному окисленні метану у вугільних шахтах;

-дослідити фізіологічні властивості метанотрофних бактерій;

-вивчити особливості їх взаємодії з гірськими породами та вугіллям, визначити закономірності адгезії даних бактерій на твердих матеріалах і розробити методи управління цим процесом;

-розробити технологічні способи вирощування клітин мета-

нотрофних бактерій в шахтних умовах, прийоми стабілізації їх фізіологічної активності та оцінити перспективність застосування цих мікроорганізмів для окислення метану у вироблених просторах вугільних шахт.

Наукова новизна. На захист виносяться наступні нові положення.

Метанотрофні бактерії широко поширені у водах вугільних шахт і не виділяються з гірського масиву, що свідчить про те, що ці мікроорганізми не є аборигенною мікрофлорою вугільних шахт, а занесені туди з поверхні Землі. Функціонування таких мікроорганізмів у шахтних водах може інгібуватись гідрокарбонатами, іонами магнію та хлоридом натрію. Метанотрофна мікрофлора шахтних вод окислює не більше 0,013% об'єму метану, що виділяється в гірничі виробки і практично не впливає на формування метанвмісної атмосфери цих виробок.

Установлені трофічні потреби метанотрофних бактерій в метані, кисні та мінеральних сполуках. Показано, що перспективним способом визначення цих потреб є їх оцінка через питомі концентрації субстратів. Визначені величини питомих концентрацій субстратів, оптимальні для росту метанотрофів, лімітуючі та інгібуючі його. Роста активність цих мікроорганізмів і інтенсивність окислення ними метану можуть бути істотно збільшені при їх взаємодії з високодисперсним діоксидом кремнію і його модифікованими формами, а також глинистими мінералами.

Досліджені види метанотрофних бактерій значно відрізняються електроповерхневими властивостями. Електрокінетичний потенціал цих бактерій істотно впливає на їх адгезію до твердих матеріалів. В слабкокислому середовищі (рН 5,0) їх дзета-потенціал має частіше всього низькі негативні значення. В таких умовах дані бактерії легко вступають в контактну взаємодію в твердими матеріалами. З підвищенням рН дисперсійного середовища негативний заряд поверхні бактерій збільшується, а можливість їх контактної взаємодії в твердими матеріалами зменшується. Показано, що збільшити адгезію метанотрофних бактерій до твердих матеріалів можна шляхом їх обробки іонами тривалентних металів, в першу чергу іонами алюмінію, які значно знижують негативний заряд поверхні, а в деяких випадках - глинистими мінералами.

Значна роль в адгезії метанотрофних бактерій належить гідрофобній взаємодії. Досліджені мікроорганізмами істотно відрізняються показниками гідрофобності поверхні. Найбільш вираженими гідрофобними властивостями характеризуються бактерії *Methylocystis parvus* OBER. Вони в значних кількостях закріплюються на твердих матеріалах.

Гірські породи та кам'яне вугілля містять широкий спектр водорозчинних мінеральних сполук. При взаємодії живильного середовища з цими матеріалами можуть спостерігатись зміни його складу. Метанотрофні бактерії, що іммобілізовані на цих матеріалах мають більш високу метанокислювальну активність в порівнянні з клітинами, що знаходяться в суспензії. Показано, що найбільш інтенсивне окислення метану іммобілізованими бактеріями спостерігається при його концентрації в метано-повітряній суміші від 30 до 60%. З врахуванням цього, а також особливостей розподілу метану у вироблених просторах вугільних шахт розроблений прогноз інтенсивності його окислення в різних зонах цих просторів. Згідно з отриманими результатами цей процес досягатиме максимальної активності на відстані 20-50 м від лави забою.

Установлена можливість і відпрацьовані біотехнологічні підходи використання метану, що видобувається з вугільних пластів, як вуглецевої сировини для одержання біомаси метанотрофних бактерій. Результати експериментальних досліджень є основою запропонованого методу мікробіологічного окислення метану у вироблених просторах вугільних шахт, висока ефективність якого доведена промисловими випробуваннями на двох шахтах Донбасу.

Практичне значення. Результати досліджень можуть знайти застосування в біотехнології одержання мікробної біомаси і ряду метаболітів при використанні метану як джерела вуглецевого живлення, а також в процесах знешкодження галогенпохідних вуглеводнів та інших сполук в навколишньому середовищі. Виконаний комплекс наукових досліджень вирішує основні питання біотехнологічного застосування метанотрофних бактерій для окислення метану у вироблених просторах вугільних шахт. Визначені трофічні потреби метанотрофних бактерій, що дозволяє керувати їх фізіологічною активністю. Встановлені значення температур і рН середовища, в межах яких доцільно використовувати окремі види метанотро-

фів для окислення метану у вироблених просторах вугільних шахт.

Створена шахтна ферментаційна установка і розроблений метод одержання на ній біомаси метанотрофних бактерій, яка може використовуватись в процесі мікробіологічного окислення метану у вироблених просторах вугільних шахт, а також як добавка в тваринний раціон. Джерелом вуглецю і енергії в цьому процесі є метан, що видобувається з вугільних пластів.

Розроблені способи стабілізації фізіологічної активності метанотрофів перед їх біотехнологічним застосуванням. Показано, що для досягнення цієї мети суспензію даних мікроорганізмів слід зберігати у відсутності газів або в атмосфері метану, гелію чи при взаємодії клітин з глинистим мінералом палигорськітом.

Запропоновані методи зниження в шахтних водах концентрації гідрокарбонатів та іонів магнію, що інгібують життєдіяльність в них метанотрофних бактерій. Це дозволяє застосовувати такі води як основу живильних середовищ при мікробіологічному окисленні метану у вироблених просторах вугільних шахт.

Розроблені способи управління процесом іммобілізації метанотрофних бактерій на твердих матеріалах. В процесі промислових випробувань, які виконані на двох шахтах Донбасу, показано, що застосування метанотрофних бактерій для окислення метану у вироблених просторах вугільних шахт дозволило знизити його виділення з цих просторів більш ніж на 40% і, таким чином, підвищити безпеку проведення вугледобувних робіт.

Апробація роботи. Матеріали дисертації доповідались на II Республіканській конференції молодих учених (Київ, 1974); IV, V, VII з'їздах Українського мікробіологічного товариства (Київ, 1975, Дніпропетровськ, 1980, Чернівці, 1989); I Республіканській конференції молодих учених-мікробіологів Узбекистану (Ташкент, 1976); Всесоюзній конференції "Комплексні дослідження фізичних властивостей гірських порід" (Москва, 1977); VI з'їзді Всесоюзного мікробіологічного товариства (Рига, 1980), IV симпозиумі соціалістичних країн в біотехнології (Болгарія, Варна, 1986); IV Всесоюзній конференції "Кероване культивування мікроорганізмів" (Пушино, 1986); IX Міжнародному симпозиумі "Безперервна культура в біотехнології і природі" (ЧССР, Градек Кралоуе, 1987); VI Всесоюзному симпозиумі "Інженерна ензимологія" (Вільнюс, 1988); Міжна-

родному симпозиумі "Інтербіотех'89" (ЧССР, Братіслава, 1989); Все-союзному симпозиумі "Мікробіологія охорони біосфери в регіонах Уралу і Північного Прикаспію" (Оренбург, 1991); Міжнародних читаннях з біоколоїдної хімії, присвячених пам'яті А. В. Думанського (Київ, 1993); І Установчому з'їзді Мікробіологічного товариства України (Одеса, 1993).

Публікація результатів досліджень. Основні результати досліджень відображені в 50 наукових роботах, в тому числі одній монографії та трьох винаходах.

Структура та об'єм роботи. Дисертація складається з вступу, семи розділів, заключної частини, висновків, списку літератури та додатку. Робота викладена на 442 сторінках (обліковий текст-353 сторінки), включаючи 39 таблиць, 99 рисунків та бібліографічний покажчик з 567 джерел літератури (303 на іноземній мові).

Робота виконана в Інституті мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного АН України. Розробка, монтаж та введення в експлуатацію шахтної ферментаційної установки, прогноз інтенсивності мікробіологічного окислення метану у вироблених просторах вугільних шахт та промислові випробування цієї біотехнології проведені разом з співробітниками лабораторії геотехнічних способів управління газовиділенням у вугільних шахтах Інституту геотехнічної механіки АН України (зав. -д. т. н. В. І. М'якенький).

Автор висловлює глибоку вдячність особам, які допомагали виконанню його дисертаційної роботи.

ЗМІСТ РОБОТИ

Розділ 1. Деякі властивості метанотрофних бактерій і умови їх життєдіяльності в природних еконішах, в тому числі у вугільних шахтах

В розділі подається літературна інформація про трофічні потреби метанотрофів, їх розповсюдження в природі, умови функціонування у вугільних шахтах.

Розділ 2. Життєдіяльність мікроорганізмів при взаємодії з твердими матеріалами

Розглядаються закономірності взаємодії мікроорганізмів з

твердими матеріалами, впливу цього процесу на фізіологічну активність мікробних популяцій.

Розділ 3. Матеріали і методи

Подається інформація про об'єкти досліджень, методи культивування мікроорганізмів, оцінки їх трофічних потреб, взаємодії з твердими матеріалами, іммобілізації бактерій на них, аналізу середовища життєдіяльності метанотрофів, їх кількості і фізіологічної активності.

Розділ 4. Вугільні шахти як екологічна ніша для метанотрофних бактерій

Дослідження розповсюдження метанотрофних бактерій у вугільних шахтах дозволяє розширити уявлення про екологію цих мікроорганізмів і може бути основою визначення їх ролі у формуванні метанвмісної атмосфери гірничих виробок. В результаті мікробіологічного дослідження 11 шахт Донбасу встановлено, що метанотрофні мікроорганізми широко розповсюджені у водах шахт, які характеризуються значним метановиділенням, рідко зустрічаються в негазових шахтах і не виділяються в свіжооголеного гірського масиву. Таким чином, метанотрофні бактерії не є аборигенною мікрофлорою вугільних шахт, а занесені туди з поверхні Землі.

Кількість метанотрофних бактерій у водах шахт, що характеризуються інтенсивним виділенням метану, складає від 10^2 до $3 \cdot 10^5$ клітин/мл. На основі результатів, що характеризують вміст метанотрофних бактерій в шахтних водах, метанокислювальної активності мікроорганізмів в них, обводнення шахт та інтенсивності виділення метану, нами визначена роль цих бактерій в формуванні атмосфери гірничих виробок. Встановлено, що метанотрофна мікрофлора шахтних вод може окислити від частки кубометра до декількох кубометрів метану на добу. Якщо ж врахувати, що газовиділення в шахтах досягає $33 \cdot 10^3$ - $89 \cdot 10^3$ м³/добу, стає зрозумілим, що ці мікроорганізми окислюють не більше 0,01% метану від його сумарного об'єму, що виділяється в гірничі виробки. Таким чином, життєдіяльність метанотрофних бактерій в шахтних водах не спричиняє значного впливу на формування метанвмісної атмосфе-

ри гірничих виробок.

Можна було б припустити, що в таких умовах доцільно інтенсифікувати мікробіологічне окислення метану в шахтних водах, оптимізуючи в них життєдіяльність метанотрофів. Однак, враховуючи те, що виробки обстежених шахт, як правило, щогодинно поповнюються десятками та сотнями кубометрів води, такий підхід є малоперспективним в зв'язку з оновленням складу шахтної води за незначний проміжок часу (13-17 годин).

З метою визначення можливості використання шахтних вод як основи для приготування живильного середовища, що необхідне в процесі мікробіологічного окислення метану у вугільних шахтах, досліджені закономірності функціонування метанотрофних бактерій в цих водах. Встановлено, що життєдіяльність метанотрофів в даних умовах лімітується азот- і фосформісними речовинами, практично відсутніми в цих водах. Однак, в ряді випадків, внесення в шахтні води азот- і фосформісних солей не викликало значного збільшення ростової та метанокислювальної активності бактерій. Це свідчить про вміст в шахтних водах інгібіторів життєдіяльності бактерій.

З метою їх визначення досліджена залежність фізіологічної активності метанотрофів від концентрації різних іонів, вміст яких в живильному середовищі збільшували до рівнів, що визначались в шахтних водах. В найбільш високих концентраціях в шахтних водах містились іони хлору, натрію, магнію, кальцію, сульфату та гідрокарбонату.

Було показано, що підвищення концентрації NaCl в живильному середовищі понад 3,5 г/л (вміст іонів натрію і хлору 1 390 і 2 110 мг/л, відповідно) призводить до інгібування життєдіяльності метанотрофів. При концентрації цієї солі 15 г/л метанокислювальна активність бактерій знижувалась більше ніж на 40%, а збільшення її вмісту до 30 г/л обумовлювало повне інгібування дихання цих мікроорганізмів. Внесення в живильне середовище невисоких концентрацій гідрокарбонатів (до 500 мг/л) стимулювало ріст бактерій і окислення ними метану. Однак при більш високих концентраціях цих іонів спостерігалось інгібування життєдіяльності метанотрофів. Істотно знижувався приріст біомаси *Methylomonas rubra* 15 ш при збільшенні в живильному се-

редовищі вмісту іонів магнію понад 100 мг/л. В той же час, зміна в живильному середовищі концентрації іонів кальцію до 500 мг/л і сульфатів до 3 600 мг/л слабо впливала на ріст даних бактерій.

При порівнянні отриманих результатів з даними, що характеризують вміст мінеральних речовин в шахтних водах стає зрозумілим, що інгібування фізіологічної активності метанотрофних бактерій у воді шахти "Ясинівська-Глибока" обумовлене високим вмістом гідрокарбонатів. Вода шахти "Московська" та "Кантарська" містить інгібуючі концентрації іонів магнію. У воді шахти ім. Ленінського комсомолу України інгібування життєдіяльності

метанотрофів обумовлене високим вмістом іонів хлору, натрію, магнію і, можливо, кальцію.

Розроблені способи зниження в шахтних водах вмісту деяких мінеральних сполук, що інгібують життєдіяльність метанотрофних бактерій. Так, для видалення надлишку гідрокарбонатів з цих вод, запропоновано їх підкислювати до рН 6,0. При цьому гідрокарбонати переходять в форму вільної вуглекислоти (Лурье, Рыбникова, 1984), яку можна усунути з води шляхом її аерації. Установлено, що аерація цієї води на протязі 15 хвилин дозволяє знизити вміст в ній гідрокарбонатів більш ніж в 2 рази. Після внесення в оброблену таким способом воду, азотнокислого калію (0,1%) та дво-

і двозаміщеного фосфорнокислого

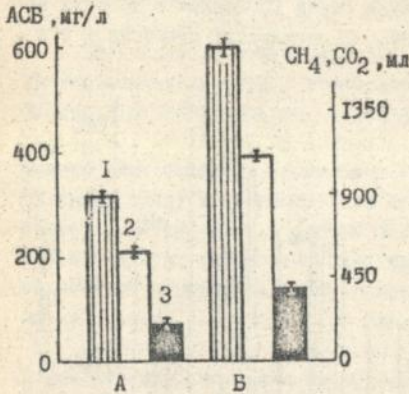


Рис. 1. Приріст біомаси (1), споживання метану (2) та виділення вуглекислоти (3) при культивуванні бактерій *M. rubra* 15ш в живильному середовищі (А) та у воді шахти "Ясинівська-Глибока" після попереднього зниження в ній концентрації гідрокарбонатів і внесення 0,05% KH_2PO_4 , 0,05% $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ і 0,1% KNO_3 (Б).

і двозаміщеного фосфорнокислого

калію (0,05%, рис.1), а також доведення рН до 7,0, вона була придатна для культивування метанотрофних бактерій. В такому живильному середовищі приріст біомаси *M. rubra* 15ш, окислення бактеріями метану та виділення вуглекислоти були на більш високому рівні, ніж в контролі (живильне середовище К).

З метою зниження в шахтних водах концентрації іонів магнію використовували їх властивість випадати в осад у вигляді фосфорнокислих солей при взаємодії з двоаміщеним фосфорнокислим натрієм. Внесення в шахтні води цієї солі супроводжувалось зниженням в них концентрації іонів магнію та кальцію. Досліджено залежність процесу їх осадження від часу взаємодії і кількості внесеної солі. Стан рівноваги осадження іонів магнію та кальцію встановлювався через 10 хвилин з моменту додання цього реагента у воду. В результаті внесення 1 г/л

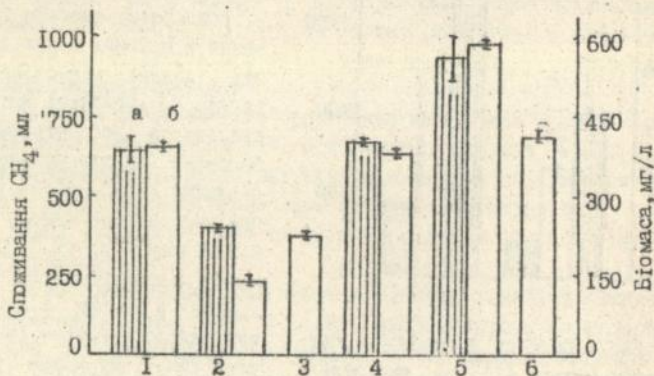


Рис. 2. Споживання метану (а) і приріст біомаси (б) *Methylobacillus rubra* 15ш при їх культивуванні: 1-в живильному середовищі; 2-у воді шахти "Московська"; після внесення у воду (г/л): KNO_3 -1,0, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ -0,5, KH_2PO_4 -0,5; 3-при рН 7,0; 4-6-після додаткового внесення $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$: 4-0,7; 5-1,0; 6-1,5. двоаміщенимого фосфорнокислого натрію у воду шахти "Московська",

її рН підвищувалась до 7,0, вміст в ній іонів магнію знижувався до 116 мг/л, а іонів кальцію - до 15 мг/л. Після додаткового внесення азотнокислого калію в оброблену таким методом воду життєдіяльність в ній метанотрофних бактерій була на більш високому рівні, ніж в контрольному живильному середовищі К (рис. 2). Таким чином, розроблено способи зниження в шахтних водах інгібуєчих концентрацій деяких сполук, що дозволяє використовувати ці води як основу для приготування живильного середовища, необхідного в процесі мікробіологічного окислення метану у вироблених просторах вугільних шахт.

Розділ 5. Фізіологічні властивості метанотрофних бактерій

Ефективність біотехнологій, які засновані на використанні бактеріальних культур, визначається їх властивостями, а також фізико-хімічними умовами середовища функціонування мікроорганізмів. З метою пошуку оптимальних режимів культивування метанотрофних бактерій, управління їх фізіологічною активністю, досліджені деякі властивості цих мікроорганізмів. Установлено, що бактерії *Methylocystis parvus* OBVP та *Methylococcus capsulatus* BCB-874 здатні інтенсивно окислювати метан в широкому діапазоні значень рН середовища. Його споживання іншими дослідженими метанотрофами відбувається в більш вузьких межах значень рН.

Найбільш помітний приріст біомаси і інтенсивність окислення метану бактеріями *Methylocystis parvus* OBVP, *Methylomonas rubra* 15 Ш і *Methylosinus trichosporium* OB3b спостерігався при температурі 30 °С (рис. 3). В цих умовах мікроорганізми *M. parvus* OBVP споживали в 1,5 раза більший об'єм метану в порівнянні з іншими культурами метанотрофів. Звідси випливає, що бактерії *M. parvus* OBVP є найбільш перспективними для їх застосування в процесі бактеріального окислення метану у вироблених просторах шахт на глибинах 600-800 м, де температура гірського масиву досягає 27-33 °С.

Мікроорганізми *M. capsulatus* BCB-874 характеризуються найбільш інтенсивним ростом та споживанням метану при температурах 37-43 °С. В таких умовах вони окислюють в 2 рази більші об'єми метану, ніж бактерії *M. rubra* 15 Ш при температурі, оптима-

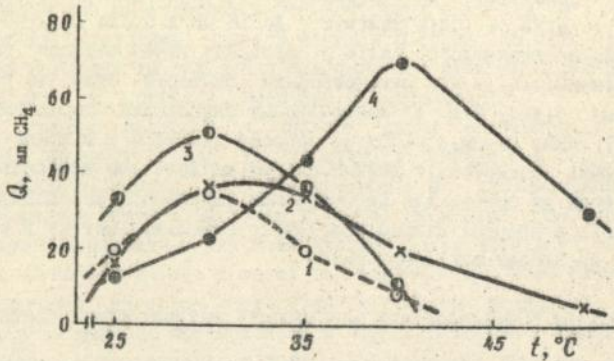


Рис. 3. Залежність інтенсивності окислення метану (Q) різними видами метанотрофних бактерій від температури інкубування. 1 - *M. rubra* 15ш; 2 - *M. trichosporium* OE3b; 3 - *M. parvus* OBBP; 4 - *M. capsulatus* BCB-874.

льний для росту (рис. 3). Таким чином, мікроорганізми *M. capsulatus* BCB-874 слід застосовувати для мікробіологічної обробки вироблених просторів вугільних шахт, в яких вугілля добувають на глибині понад 800 м.

Досліджено залежність інтенсивності росту та окислення метану бактеріями *M. rubra* 15 ш від його концентрації в метано-повітряній суміші. Показано, що збільшення вмісту цього газу в даній суміші до 21 % супроводжується підвищенням фізіологічної активності досліджуваних бактерій. Однак подальше збільшення концентрації CH₄ в такій суміші призводить до істотного зниження приросту біомаси та споживання метану бактеріями. Якщо ж у вихідних газівих сумішах вміст метану підтримували на однаковому рівні (близько 20%), інтенсивність росту бактерій і окислення ними метану зростала по мірі збільшення його концентрації аж до 43%. Це свідчить про лімітування життєдіяльності метанотрофів киснем при вмісті метану понад 21% в його сумішах в повітрях, які використовувались в першій серії експериментів.

Слід відзначити, що інтенсивність росту метанотрофних бактерій визначається не тільки масопереносом кисню в культуральну рідину, але й густиною популяції в ній. Так, при вмісті в культуральній рідині 330 мг/л бактерій найбільш інтенсивний ріст *M. rubra* 15 ш спостерігався при масопереносі кисню, що досягав 760 мг O_2 /л·годину (рис. 4). В умовах більш низького масопереносу кисню в рідину спостерігалось лімітування, а при більш

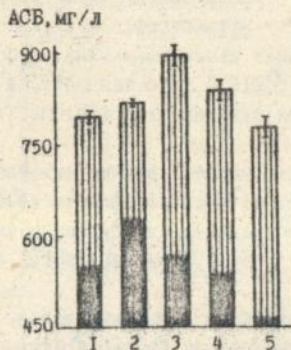


Рис. 4. Накопичення біомаси бактеріями *M. rubra* 15ш в залежності від інтенсивності масопереносу кисню (мг O_2 /л·годину): 1-340; 2-760; 3- 1360; 4- 1660; 5-2420. Вміст клітин на початку експерименту: ■ - 330; ▨ - 530 мг/л.

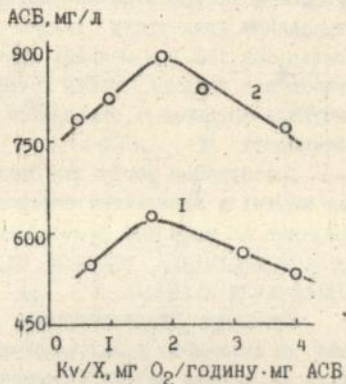


Рис. 5. Накопичення біомаси бактеріями *M. rubra* 15ш в залежності від питомого масопереносу кисню. Вміст клітин на початку експерименту: 1-330; 2-530 мг/л.

високих значеннях-інгібування росту бактерій. Збільшення густоти популяції мікроорганізмів до 530 мг/л супроводжувалось змещенням границь лімітування та інгібування їх ростової активності, а найбільш помітний приріст біомаси досягався при ма-

сопереності кисню 1360 мг/л годину.

В той же час значення масопереносу кисню, оптимальні для росту популяції мікроорганізмів різної густоти, віднесені до відповідних рівнів біомаси, знаходились в одних і тих же межах. Це дозволило нам вирааити потребу метанотрофів в кісні через величини його питомого масопереносу. Встановлено, що оптимальні для росту бактерій *M. rubra* 15ш значення питомого масопереносу кисню знаходяться в межах 1,1-2,3 мг O_2 /годину·мг біомаси (рис. 5).

Приблизно такі ж величини питомого масопереносу кисню були оптимальними для росту іншого виду метанотрофів-*Methylococcus ustanicus* 160. При менших значеннях цього показника спостерігалось лімітування росту метанотрофів, а його значення, що перевищували оптимальні, спричиняли інгібування їх фізіологічної активності.

Інгібування росту цих бактерій киснем значно знижувалось при заміні в живильному середовищі нітратного джерела азотного живлення на амонійне. Це, можливо, обумовлено інгібуванням високими концентраціями кисню, в першу чергу, асиміляційного шляху відновлення нітратів.

Визначено стехіометричні показники окислення метану чистими та змішаними культурами метанотрофних бактерій. Установлено, що окислення метану змішаними культурами, в склад яких, поряд з метанотрофом, входили мікроорганізми, що не засвоювали метан, пов'язано з споживаннями більшого об'єму кисню, ніж при його окисленні чистими культурами. На синтез 1 г клітин (в розрахунку на абсолютно суху біомасу) чистою культурою *M. rubra* 15ш споживалось 1,35 г метану і 3,55 г кисню. При цьому бактерії виділяли 1,14 г вуглекислоти. В даному випадку близько 20% вуглецю окисленого метану накопичувалось в культуральній рідині у вигляді метаболітів.

В той же час, затрати метану на накопичення 1 г клітин змішаною культурою були нижчі і становили 1,25 г, а споживання кисню та виділення вуглекислоти зростало, відповідно, до 3,75 г і 1,6 г. Метаболіти в культуральній рідині накопичувались в незначних кількостях. Таким чином, одержані результати дозволяють прогнозувати можливі затрати компонентів газових сумішей

при окисленні метану мікроорганізмами, а також дають уявлення про ефективність накопичення біомаси чистою та змішаною культурами метанотрофів.

Досліджено потреби метанотрофних бактерій в джерелах мінерального живлення. Показано, що в залежності від кількості біомаси в культуральній рідині практично всі досліджені концентрації мінеральних компонентів живильного середовища можуть бути оптимальними, лімітуючими чи інгібуючими ріст бактерій. Так, при культивуванні *M. rubra* 15ш в середовищі з різними концентраціями азотнокислого калію і вмістом в суспензії 80 мг/л клітин найбільш інтенсивний ріст цих мікроорганізмів спос-

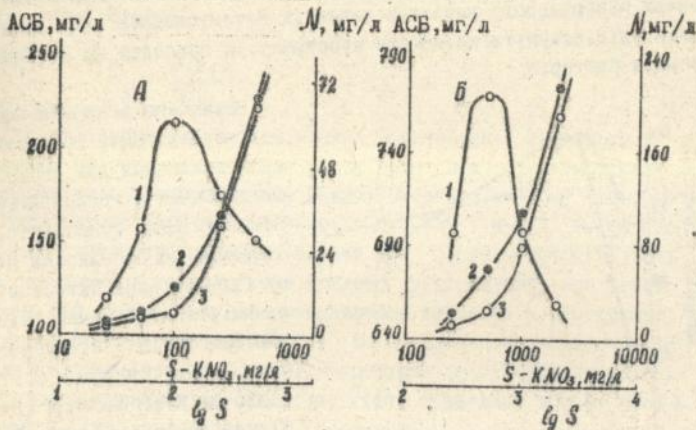


Рис. 6. Накопичення біомаси *M. rubra* 15ш в залежності від концентрації KNO_3 в живильному середовищі. А, Б-вміст клітин на початку культивування бактерій - 80, 400 мг/л, відповідно; 1-біомаса; 2, 3-концентрація азоту на початку і в кінці експерименту.

терівався в середовищі, що містило 100 мг/л даної солі (рис. 6). Зниження її концентрації призводило до лімітування росту, а підвищення-до його інгібування.

При збільшенні густоти популяції бактерій в 5 разів (до 400

мг/л) границі лімітування та інгібування їх росту змішувались. В цьому випадку найбільш інтенсивний ріст популяції відбувався в середовищі, що містило 500 мг/л нітрату калію. Це в 5 разів перевищувало концентрацію цієї солі, яка була оптимальною при вмісті в культуральній рідині 80 мг/л біомаси.

Подібна залежність інтенсивності росту метанотрофів як від концентрації субстрату в середовищі, так і вмісту в ньому клітин бактерій, встановлена нами для іншого джерела їх азотного живлення - сульфату амонію, і інших мінеральних сполук: фосфорнокислого калію, сульфату магнію та тривалентного заліза. Отримані результати дозволяють виразити потреби мікроорганізмів в елементах мінерального живлення через їх питомі концентрації, під якими слід розуміти кількість субстрату, що припадає на одиницю біомаси бактерій.

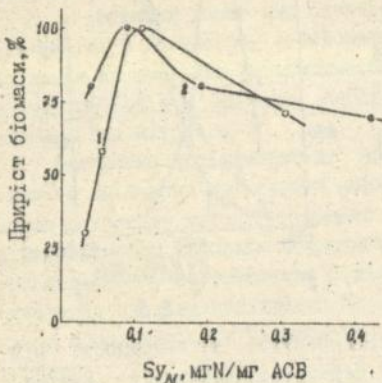


Рис. 7. Приріст біомаси бактерій *M. rubra* 15ш в залежності від питомої концентрації нітратного азоту (S_N) в живильному середовищі: 1-вміст біомаси бактерій на початку експерименту - 80 ; 2- 400 мг/д.

Таким чином, запропонований спосіб визначення трофічних пот-

Визначено величини питомих концентрацій іонів, які є оптимальними для росту досліджуваних мікроорганізмів. Значення цих показників, одержані на популяціях різної густоти, знаходяться в одних і тих же межах величин. Для іонів нітратного азоту вони складають 0,075-0,125 мг N/мг біомаси (рис. 7), для іонів амонію-0,12-0,29 мг N/мг біомаси. Оптимальні для росту цих мікроорганізмів питомі концентрації фосфатів знаходяться в діапазоні 0,031-0,089 мг P/мг біомаси, іонів тривалентного заліза 0,0048-0,0084 мг Fe^{3+} /мг біомаси, іонів магнію 0,22-0,60 мг Mg^{2+} /мг біомаси.

реб мікроорганізмів в джерелах живлення через їх питомі концентрації та встановлено оптимальні потреби метанотрофних бактерій в мінеральних субстратах.

З отриманих даних витікає, що для досягнення найбільш інтенсивного росту мікроорганізмів повинна дотримуватись така рівність:

$$S(t_1) = S_y \cdot X(t_1),$$

де: $S(t_1)$ - концентрація субстрату в середовищі в проміжок часу t_1 ; S_y - питома концентрація субстрату, оптимальна для росту бактерій; $X(t_1)$ - відповідний рівень біомаси в проміжок часу t_1 . Звідси, питома концентрація субстрату, оптимальна для росту мікроорганізмів, буде становити:

$$S_y = \frac{S(t_1)}{X(t_1)}$$

Проаналізуємо умови підтримання концентрації субстрату в середовищі на оптимальному для росту рівні при культивуванні мікроорганізмів в періодичному режимі. Очевидно, кожному проміжку часу буде відповідати певний приріст біомаси і деяке зменшення кількості субстрату. Тому оптимальний для росту мікроорганізмів склад середовища технологічно можливо підтримувати при безперервному або дискретному, але регулярному внесенні в середовище додаткових порцій субстрату $S_g(t)$, що повинні компенсувати різницю між оптимальною для росту концентрацією субстрату $S_y X(t)$ і поточною концентрацією субстрату $S(t)$ в будь-який момент часу t . Величина $S_g(t)$ визначається за формулою:

$$S_g(t) = S_y X(t) - S(t)$$

Процедуру внесення відповідних порцій свіжого середовища з необхідною концентрацією субстрату повторюють з максимальною частотою.

Функції розподілу в часі концентрації субстрату встановлені раніше (Малашенко з співавт., 1986). Вони можуть бути використані для розрахунку значень концентрацій субстрату $S(t)$ та біомаси $X(t)$ в даному періодичному процесі. Враховуючи це, а також те, що $S_0 = S_y \cdot X_0$ отримуємо при $\mu = \text{const}$

$$S(t) = X_0 \left[S_y - \frac{1}{V} (e^{\mu t} - 1) \right], \quad X(t) = X_0 e^{\mu t} \quad (\text{Петр, 1978});$$

при $\mu = a \cdot S(t)$

$$S(t) = S_0 \left(S_y + \frac{1}{Y} \right) \left[\frac{1}{Y} e^{a X_0 \left(S_y + \frac{1}{Y} \right) t} + S_y \right]^{-1},$$

$$X(t) = X_0 \left(S_y + \frac{1}{Y} \right) e^{a X_0 \left(S_y + \frac{1}{Y} \right) t} \left[\frac{1}{Y} e^{a X_0 \left(S_y + \frac{1}{Y} \right) t} + S_y \right]^{-1},$$

де μ - питома швидкість росту бактерій; Y - економічний коефіцієнт використання субстрату, const; S_0, X_0 - значення концентрацій субстрату і біомаси відповідно до початку проміжку часу; a - коефіцієнт пропорційності, const.

Таким чином, якщо в середовищі підтримувати вміст поживних речовин на рівнях питомих концентрацій, оптимальних для росту мікроорганізмів, то ріст культури на протязі тривалого часу буде відбуватись з максимальною швидкістю, що може стати основою інтенсифікації періодичних процесів. Принцип культивування мікроорганізмів, заснований на регулюванні питомої концентрації субстрату, запропоновано охарактеризувати як укостат. З позицій питомих концентрацій субстрату проаналізовано ріст мікроорганізмів в періодичному режимі.

Розділ 6. Закономірності взаємодії метанотрофних бактерій з твердими матеріалами

Імобілізовані на твердих матеріалах метанотрофні бактерії можуть знайти застосування в ряді біотехнологій, в першу чергу в процесі бактеріального зниження метановиділення у вугільних шахтах. Не зважаючи на значний біотехнологічний потенціал цих мікроорганізмів, закономірності їх взаємодії з твердими матеріалами, в тому числі з вугіллям та гірськими породами, досліджені недостатньо.

Нами показано, що кам'яне вугілля та гірські породи містять широкий спектр водорозчинних мінеральних сполук. З цих матеріалів в значній кількості екстрагуються водою іони натрію, хлору, гідрокарбонати, а іноді сульфати. В меншій мірі екстрагуються катіони калію, кальцію та магнію, тоді як азот- та фосфорвмісні сполуки у воді після її взаємодії з такими матеріалами вищачились в незначних кількостях або взагалі були відсутні.

При взаємодії живильного середовища з зразками кам'яного вугілля та гірських порід в складі середовища збільшується концентрація мінеральних сполук, що містяться в значній кількості в цих твердих матеріалах (сульфатів, гідрокарбонатів, іонів калію, магнію, хлору), тоді як вміст джерел азотного та фосфорного живлення мікроорганізмів знижувався. При цьому також спостерігалась зміна рН живильного середовища.

Взаємодія цього середовища з вугіллям та гірськими породами, в основному, не викликала негативного впливу на життєдіяльність в ньому метанотрофних бактерій. Більш того, контакт бактерій *M. rubra* 15ш з гірськими породами приводив до того, що інтенсивність окислення цими мікроорганізмами метану збільшувалася вдвічі в порівнянні з клітинами, що знаходились у вигляді суспензії (табл. 1). Однак наявність змін в його складі свідчить про необхідність внесення поправок в склад живильного середовища, які б враховували результати його взаємодії з цими твердими матеріалами в процесі бактеріального окислення метану у вугільних шахтах.

З метою розробки способів іммобілізації метанотрофних бактерій на кам'яному вугіллі та гірській породі нами досліджені закономірності закріплення цих мікроорганізмів на твердих поверхнях. Показано, що короткочасна взаємодія бактерій *M. rubra* 15ш з гірськими породами супроводжується адгезією на них 10-25% клітин від їх чисельності в суспензії. Однак після їх взаємодії на протязі 30 хвилин на цих породах закріплювалось більше половини клітин даних мікроорганізмів, а рівновага цього процесу наступала лише в кінці третьої години. На зразках вугілля адгезія бактерій відбувалась більш інтенсивно. Нами показано, що уже через 4 хвилини з початку взаємодії бактерій з вугіллям на ньому закріплювалось близько 50% клітин *M. rubra* 15ш.

Досліджено адгезію метанотрофів до твердих матеріалів в воложності від площі їх поверхні та концентрації суспензії мікроорганізмів. Не зважаючи на те, що загальна кількість бактерій, які адгезувались до поверхні гірських порід, збільшувалась при зростанні площі твердої поверхні та вмісту клітин в суспензії, по мірі зростання чисельності бактерій в ній, процентний вміст адгезованих клітин зменшувався. Подібна закономірність мала

місце при дослідженні адгезії цих мікроорганізмів на зразках вугілля.

Таблиця 1

Споживання метану, кисню та виділення вуглекислоти бактеріями M. rubra 15ш при контактi з гірськими породами.

Гірська порода	Варіант експерименту	Споживання		Виділення
		метану, мл	кисню, мл	вуглекислоти, мл
шахти ім. ЛКУ	Суспензія бактерій	20,2±5,6	11,1±1,5	2,0±0,3
	Бактерії, що іммобілізовані на породі	41,3±2,2	31,3±2,0	10,3±0,7
	Зволожена порода	-	-	-
шахти ім. Бажанова	Суспензія бактерій	13,8±1,7	12,7±1,9	4,3±0,7
	Бактерії, що іммобілізовані на породі	32,6±1,8	23,6±0,6	6,6±0,8
	Зволожена порода	-	-	-

Примітка: "-" - змін в складі газової суміші не виявлено.

Динаміка закріплення бактерій M. rubra 15ш на поверхні зразків вугілля, що відрізняються ступенем метаморфізму, чи на гірських породах, які були видібрані в різних шахт, істотно не відрізнялась. В той же час при контактi різних видів метано-

трофів з зразками однієї і тієї ж гірської породи або скла спостерігались істотні відмінності в швидкості адгезії бак-

терій. Найбільш інтенсивною адгезією до цих матеріалів характеризувались бактерії *M. parvus* ОБВР і *M. rubra* 15ш. Після трьох годин взаємодії на поверхні скла та гірських порід закріплювалось близько 70-80% мікроорганізмів (рис. 8). В той же час адгезія бактерій *M. capsulatus* ВСВ-874 і, особливо, *M. trichosporium* ОБЗб була значно нижчою і не перевищувала 60%.

Таким чином, при тривалій взаємодії метанотрофних бактерій з твердими матеріалами, на них адгезується значна кількість клітин. Однак при короткочасному контакті, що буде мати місце в процесі мікробіологічного окислення метану в вироблених просторах вугільних шахт, на цих матеріалах може закріплюватись незначна

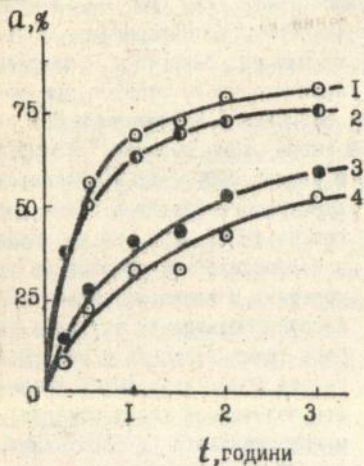


Рис. 8. Залежність адгезії метанотрофів (α) до гірської породи шахти ім. ЛКУ від часу взаємодії (t). 1-*M. rubra* 15ш; 2-*M. parvus* ОБВР; 3-*M. capsulatus* ВСВ-874; 4-*M. trichosporium* ОБЗб.

кількість мікроорганізмів.

Показано, що причина цього полягає у високому електронегативному заряді як поверхні клітин різних видів метанотрофних бактерій, так і гірських порід в області нейтральних значень рН середовища. При рН 7,0 дзета-потенціал бактерій *M. parvus* ОБВР досягав -28 мВ, а мікроорганізмів *M. rubra* 15ш і *M. trichosporium* ОБЗб -22 та -23 мВ, відповідно (рис. 9).

Слід відзначити, що досліджені види метанотрофних бактерій істотно відрізняються залежністю електрокінетичного потенціалу поверхні від рН дисперсійного середовища. Так, при зниженні рН до 6,0 і більш низьких значень, дзета-потенціал бактерій *M. parvus*

ОВВР, а також *M. rubra* 15ш знижувався, що свідчить про наявність на поверхні клітин іоногенних, вірогідно, карбоксильних груп. Як показано в роботах інших дослідників (James, 1982; Amory, Rouxhet, 1988), ці групи, в основному, дисоціюють при рН середовища вище 4,0 і можуть належати, в першу чергу, полісахаридам.

В дисперсійному середовищі, що має рН близько 4,0, клітини цих мікроорганізмів досягають ізоелектричного стану, а при подальшому зниженні рН вони стають позитивно зарядженими. При рН 2,0 зета-потенціал бактерій *M. rubra* 15ш досягає +18 мВ, а

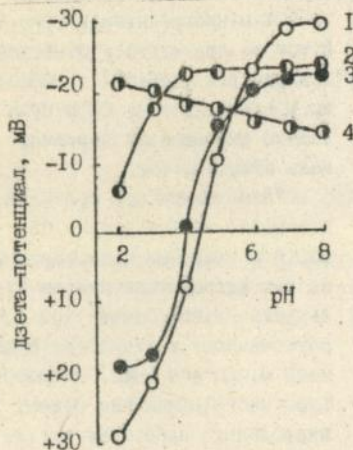


Рис. 9. Зета-потенціал клітин метанотрофів в залежності від рН середовища. 1-*M. parvus* ОВВР; 2-*M. trichosporium* ОВЗб; 3-*M. rubra* 15ш; 4-*M. capsulatus* ВСБ-874.

M. parvus ОВВР- +28 мВ. Наявність позитивного заряду в даних умовах свідчить про те, що поряд з карбоксильними групами на їх поверхні, можливо, містяться аміногрупи. Останні, як свідчать роботи інших авторів (Гузев, Звягинцев, 1973; James, 1982), визначають позитивний заряд поверхні мікроорганізмів в середовищі, що має рН нижче 4,0. Ці групи можуть належати білкам та деяким іншим полімерам.

В той же час поверхня мікроорганізмів *M. trichosporium* ОВЗб та *M. capsulatus* ВСБ-874 була більш однорідною. Так, при зниженні рН середовища від 8,0 до 4,0, зета-потенціал *M. trichosporium* ОВЗб практично не змінювався (рис. 9). В більш кислому середовищі електрокінетичний потенціал цих мікроорганізмів

значно знижувався, але й при рН 2,0 клітини мали негативний заряд. Це свідчить про можливий вміст на поверхні *M. trichosporium* ОВЗб фосфорнокислих груп. Вони, згідно з даними літератури (Amory, Rouxhet, 1988), визначають негативний заряд поверхні мікроорганізмів при рН близько 4,0.

Певні відмінності залежності дзета-потенціалу від рН середовища були одержані для клітин *M. capsulatus* БСБ-874. Якщо при рН 8,0 їх електрокінетичний потенціал досягав -14 мВ, то при підкисленні середовища значення даного показника трохи збільшувались і в області рН 2,0 досягали -21 мВ, що, вірогідно, свідчить про вміст фосфорнокислих груп на поверхні цих мікроорганізмів.

Слід відзначити, що при культивуванні метанотрофних бактерій в рівних умовах їх дзета-потенціал характеризувався відносною стабільністю. Так, цей показник у клітин, що вирощувались при споживанні метану, або метанолу, як джерел вуглецевого живлення та енергії, а також у бактерій, одержаних в рідкому чи на агаризованому середовищі, практично не відрізнявся. В той же час, в середовищі, що має рН близько 7,0 (де дзета-потенціал визначається, в основному, вмістом карбоксильних груп), популяція бактерій *M. rubra* 15ш, на основі аналізу електрокінетичних властивостей розподіляється на дві групи. Можна було б допустити, що ці розбіжності обумовлені наявністю в популяції певної частини мертвих клітин. З цією метою бактерії інактивували шляхом нагрівання. Однак це не викликало змін електрокінетичних властивостей досліджуваних мікроорганізмів.

Привертає увагу той факт, що при рН 2,0, де електрокінетичні властивості *M. rubra* 15ш визначаються позитивно зарядженими групами, популяція даних бактерій була менш гетерогенною. Це свідчить про те, що їх гетерогенність в області нейтральних значень рН середовища може бути обумовлена рівним вмістом полісахаридів на поверхні клітин.

Можна було допустити, що збільшити адгезію метанотрофних бактерій до твердих поверхонь можливо шляхом обробки клітин високодисперсними матеріалами (Гурдиш з співавт., 1982). Ймовірність цього витікає з описаних в літературі особливостей розподілу електростатичного заряду на поверхні високодисперсних матеріалів, в тому числі глинистих мінералів. На плоских частинах поверхні цих мінералів локалізований негативний заряд, а на виступаючих, гострих-позитивний (Marshall, 1969). Таким чином, на поверхні дисперсних часточок є негативно і позитивно заряджені ділянки, що могли б взаємодіяти з протилежно зарядженими групами

клітинної поверхні. Поряд з цим, у водному середовищі на твердих матеріалах можуть мати місце розриви гідратних оболонок, що призводить до виникнення на поверхні ділянок, які характеризуються гідрофобними властивостями (Фуке, 1971). Це також може значною мірою сприяти адгезії мікроорганізмів на твердих матеріалах.

Методом мікроелектрофорезу показано, що метанотрофні бактерії вступають в контактну взаємодію з часточками глинистих мінералів палигорськіту та монтморилоніту. В результаті цього клітини бактерій покриваються даними мінералами і одержують електрокінетичний потенціал, що властивий глинистим мінералам. Наявність контактної взаємодії метанотрофів з цими матеріалами також доведена методами електронної мікроскопії та явищем флокуляції суспензії бактерій при її взаємодії з глинистими мінералами. Так, внесення в суспензію *M. rubra* 15ш та *M. capsulatus* BCE-874 300-500 мг/л палигорськіту чи монтморилоніту привело до її дестабілізації. Уже через 30 хвилин клітини мікроорганізмів формували осад, що було обумовлено їх взаємодією з глинистими мінералами.

В області низьких значень рН середовища спостерігалась взаємодія метанотрофних бактерій також з часточками високодисперсного діоксиду кремнію-аеросилу А-300. Однак при нейтральних значеннях рН середовища вона була незначною і не впливала на адгезію метанотрофів до твердих матеріалів. В той же час глинисті мінерали істотно стимулювали закріплення цих мікроорганізмів на твердих матеріалах. Так, при внесенні в суспензію бактерій 100-200 мг/л палигорськіту кількість клітин *M. rubra* 15ш, що адгезувалась до поверхні скла, зростала на 70-80%. Подальше збільшення концентрації палигорськіту супроводжувалось зростанням його стимулюючого впливу на адгезію цього метанотрофа. Ще більш помітне зростання значень даного показника викликав інший глинистий мінерал-монтморилоніт. При його вмісті 100 мг/л кількість адгезованих клітин збільшувалась, в порівнянні з контролем, в 2 рази. Вплив глинистих мінералів на прикріплення бактерій *M. rubra* 15ш до гірських порід був також істотним, але досягав менших значень.

Слід відзначити, що глинисті мінерали не спричиняли стиму-

лючої дії на адгезію до твердих матеріалів бактерій *M. capsulatus* ВСБ-874. Практично при всіх досліджених концентраціях палигорськіту чи монтморилоніту кількість мікроорганізмів, що закріплювались на твердих матеріалах, була меншою, ніж при їх відсутності в суспензії. Це, на нашу думку, обумовлено низькою спорідненістю бактерій *M. capsulatus* ВСБ-874 до часточок глинистих мінералів.

Досліджено вплив ряду фізико-хімічних факторів на адгезію метанотрофних бактерій до твердих матеріалів. Показано, що з підвищенням температури інкубування бактерій під час їх взаємодії з твердими поверхнями кількість адгезованих клітин *M. rubra* 15ш та *M. trichosporium* ОБЗб зростає, досягаючи максимуму (збільшення адгезії на 10-20%) при 35-40°C. Адгезія інших досліджених метанотрофів практично не залежала від температури їх інкубування.

Більш істотний вплив на закріплення метанотрофних бактерій на твердих матеріалах спричиняє рН дисперсійного середовища. При зменшенні його значень в кислу сторону знижується негативний заряд поверхні метанотрофів (за виключенням *M. capsulatus* ВСБ-874, рис. 9), що повинно зменшувати сили відштовхування, які виникають між взаємодіючими поверхнями. При рН 3,0 бактерії *M. parvus* ОБВР і *M. rubra* 15ш мають позитивний заряд і закріплюються на поверхні скла в найбільших кількостях. Однак адгезія інших метанотрофних бактерій, що мали негативний заряд поверхні при всіх досліджених значеннях рН, мало залежала від величини даного параметра. Подібна залежність від рН середовища спостерігалась при закріпленні цих мікроорганізмів на гірських породах. Однак в даному випадку при підкисленні середовища адгезія бактерій *M. rubra* 15ш знижувалась, що не може пояснюватись діями сил електростатичної природи.

Помітний вплив на адгезію метанотрофних бактерій спричиняло внесення в дисперсійне середовище дво- і, особливо, тривалентних металів. Як відомо, їх вміст в середовищі призводить до зменшення розмірів подвійних електричних шарів, що формується на поверхнях взаємодіючих тіл, і сприяє їх контакту (Fletcher, 1979; van Loosdrecht et al., 1987). Показано, що внесення в середовище іонів магнію чи кальцію значно збільшує адгезію

бактерій *M. rubra* 15ш і *M. capsulatus* ВСЕ-874 до поверхні скла та гірських порід. Досліджено залежність цього процесу від концентрації іонів. Уже при вмісті одного з них на рівні 100 мг/л, кількість закріплених мікроорганізмів збільшувалась в декілька разів.

Ще більш істотний стимулюючий вплив на адгезію метанотрофних бактерій спричиняли іони тривалентного заліза та алюмінію. При концентрації останнього 1 мг/л клітини здобували позитивний заряд, що полегшувало їх взаємодію з твердими матеріалами. Для досягнення подібного ефекту під дією тривалентного заліза необхідні були більш високі його концентрації. Показано, що внесення в дисперсійне середовище 5-10 мг/л іонів алюмінію збільшувало в декілька разів адгезію *M. rubra* 15ш і *M. capsulatus* ВСЕ-874 до поверхні скла та гірських порід. Максимальних значень цей показник досягав при вмісті 10-30 мг/л даних іонів. В такому випадку на гірській породі закріплювалось близько 70% клітин *M. capsulatus* ВСЕ-874 від їх кількості у вихідній суспензії.

Менш помітний стимулюючий вплив на адгезію цих мікроорганізмів спричиняли іони тривалентного заліза. Максимальна кількість бактерій закріплювалась на твердих матеріалах при вмісті в середовищі понад 20 мг/л цих іонів. При їх концентрації близько 40 мг/л, кількість адгезованих клітин становила понад 70% від їх вмісту в суспензії. Таким чином, обробка клітин метанотрофних бактерій іонами тривалентних металів, в першу чергу іонами алюмінію, а в деяких випадках - глинистими мінералами, дозволяє значно збільшити адгезію цих мікроорганізмів до твердих матеріалів.

Аналізуючи електрокінетичні властивості метанотрофних бактерій (рис. 9), можна було б чекати, що найбільш помітна адгезія буде спостерігатись у мікроорганізмів *M. capsulatus* ВСЕ-874, для яких характерні найменші значення негативного заряду поверхні. Однак проведені дослідження свідчать про те, що в найбільших кількостях закріплюються на твердих матеріалах бактерії *M. parvus* ОВВР і *M. rubra* 15ш (рис. 8), які мають високий електрокінетичний потенціал. Досліджено причини цього явища. Показано, що бактерії *M. parvus* ОВВР і *M. rubra* 15ш характеризуються

високою гідрофобністю поверхні (табл. 2). Оскільки цей показник

Таблиця 2

Гідрофобність поверхні різних видів метанотрофних бактерій

Вид мікроорганізмів	Значення гідрофобності (%) в системі	
	живильне середовище- н-гексадекан	фосфатний буфер- н-гексадекан
<i>M. rubra</i> 15ш	54,9±2,0	48,7±3,7
<i>M. capsulatus</i> ВСВ-874	36,9±1,0	-
<i>M. parvus</i> ОБВР	89,2±2,3	86,6±1,6
<i>M. trichosporium</i> ОБЗб	25,6±2,4	36,1±0,5

Примітка: "-" - не визначали.

спричиняє значний вплив на процес адгезії мікроорганізмів до твердих матеріалів (Fletcher, Loeb, 1979; Ніковська з співавт., 1989), слід вважати, що якраз завдяки високій гідрофобності поверхні клітин даних бактерій вони в значній кількості закріплюються на твердих матеріалах.

Ступінь гідрофобності поверхні метанотрофів залежить від умов їх культивування (табл. 3). При вирощуванні бактерій *M. rub-*

Таблиця 3

Залежність гідрофобності та адгезії бактерій *M. rubra* 15ш до твердих матеріалів від джерела їх вуглецевого живлення

Джерело вуглецю при культивуванні бактерій	Гідрофобність бактерій, %	Назва	
		твердого матеріалу	Кількість закріплених бактерій, %
Метан	54,9±1,9	скло	65,9±2,5
		гірська порода	72,9±7,6
Метанол	43,0±6,9	скло	44,3±0,8
		гірська порода	65,2±0,2

га 15ш на метані, як єдиному джерелі вуглецю і енергії, показник

гідрофобності досягав 55%. Однак заміна метану на метанол супроводжувалась зниженням гідрофобності даних бактерій до 43%. Це призводило до істотного зниження їх адгезивних властивостей, що є додатковим доказом значного впливу ступеню гідрофобності мікроорганізмів на процес їх взаємодії з твердими матеріалами.

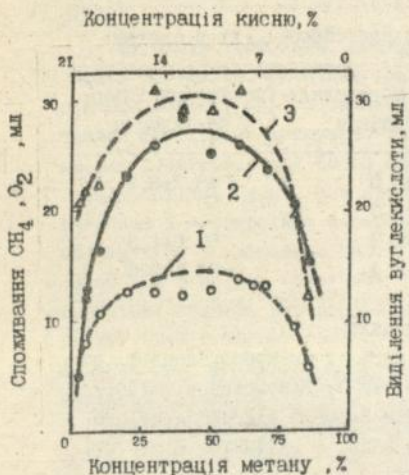


Рис. 10. Залежність споживання метану (2), кисню (3) та виділення вуглекислоти (1) іммобілізованими бактеріями *M. rubra* 15ш від концентрації CH_4 в метано-повітряній суміші.

Досліджено закономірності життєдіяльності бактерій *M. rubra* 15ш, що іммобілізовані на гірських породах, в залежності від концентрації метану в метано-повітряній суміші. Показано, що найбільш інтенсивне окислення метану, споживання кисню та виділення вуглекислоти цими мікроорганізмами відбувається при концентрації CH_4 в метано-повітряній суміші від 30 до 60% (рис. 10). Зниження його вмісту в суміші нижче оптимальних концентрацій, супроводжується лімітуванням процесу метаном. Збільшення концентрації метану до рівня, вище оптимального, також призводить до зменшення споживання цього субстрату, що, очевидно, обумовлено лімітуванням киснем життєдіяльності бактерій в даних умовах.

Розділ 7. Практичне використання метанотрофних бактерій для окислення метану у вироблених просторах вугільних шахт

Нами показано, що 1 г метанотрофних бактерій *M. capsulatus* ВСБ-874 (в перерахунку на абсолютно суху біомасу) на протязі

добі споживає близько 12 л метану. Звідси випливає, що для окислення цими мікроорганізмами заданої кількості метану необхідний для цього об'єм суспензії бактерій може бути визначений на основі такого рівняння:

$$V = \frac{Q_{CH_4}}{q \cdot n},$$

де: Q_{CH_4} - об'єм метану, який потрібно окислити мікроорганізмами;
 q - питома активність бактерій; n - вміст біомаси в суспензії.

Звідси випливає, що коли у виробленому просторі видобувної ділянки шахти створити біофільтр, який буде містити 10 м^3 суспензії, в кожному літрі якої наросте до 10 г клітин, ця кількість мікроорганізмів на протязі доби окислить близько 1 200 м^3 метану, що може складати четверту частину від його сумарного об'єму, який виділитиметься з виробленого простору шахти. Враховуючи те, що іммобілізація метанотрофних бактерій на гірських породах та вугіллі, як правило, супроводжується істотним зростанням інтенсивності окислення метану мікроорганізмами, слід чекати, що їх внесок в дегазацію вироблених просторів буде ще більш значним.

Як було показано вище (рис. 10), найбільш активне окислення метану іммобілізованими метанотрофними бактеріями відбувається при його концентрації в метано-повітряній суміші від 30 до 60%. Враховуючи ці результати, а також закономірності розподілу метану та кисню у вироблених просторах вугільних шахт, нами в співпраці з Інститутом геотехнічної механіки АН України розроблено прогноз інтенсивності окислення метану іммобілізованими бактеріями в цих просторах. Встановлено, що максимальна інтенсивність даного процесу буде досягнута в зоні, яка витягнута впродовж виробленого простору і знаходиться на відстані 20-50 м від лави забою. Найбільш широка область, яка є оптимальною для життєдіяльності метанотрофних бактерій, формуватиметься в зоні, що примикає до вентиляційної виробки. Таким чином, розроблено прогноз інтенсивності окислення метану у вироблених просторах вугільних шахт, що дозволяє визначити раціональне розміщення бактеріального фільтру в цих просторах.

Застосування метанотрофних бактерій для зниження концентрації метану у вугільних шахтах пов'язано з використанням

значних об'ємів суспензії цих мікроорганізмів. З метою її вирощування поряд з місцем застосування та виключення зниження метанокислювальної активності при її транспортуванні, а також для дослідження можливості використання в цьому процесі метану, що надходить в вугільних шахт, нами в співавторстві з Інститутом геотехнічної механіки АН України розроблена, змонтована та введена в експлуатацію на шахті "Ясинівська-Глибока" ферментаційна установка. Вона включає три ферментери об'ємом 45,90 та 1 000 л. Як джерело вуглецевого живлення для культивування мікроорганізмів використовували метан, який міститься в газах, що відкачуються з вугільних пластів. Його концентрація в цих газових сумішах становила 15-19%.

В процесі вирощування метанотрофних бактерій на цій установці реалізовані деякі елементи культивування мікроорганізмів в режимі укостату-питомі концентрації окремих субстратів підтримувались на рівні, оптимальному для росту популяції. Це, в першу чергу, відноситься до забезпечення метанотрофів киснем. З врахуванням того, що питомі значення його масопереносу, оптимальні для росту бактерій *M. rubra* 15ш, знаходяться в межах від 1,1 до 2,3 мг O_2 /л-годину, при вмісті в культуральній рідині біомаси від 300 до 1 000 мг/л масоперенос кисню задавали на рівні 740 мг/л. При збільшенні вмісту клітин в популяції до 1 000-3 000 мг/л масоперенос кисню збільшували до 3 200 мг/л, а при подальшому зростанні концентрації біомаси встановлювали більш високі його значення.

З врахуванням оптимальних для росту питомих концентрацій мінеральних компонентів живильного середовища в цьому процесі застосовували метод їх по часткового внесення. Це дозволило уникнути інгібування росту мікроорганізмів високим вмістом мінеральних речовин. Завдяки використанню цього підходу, була досягнута висока максимальна швидкість росту метанотрофів при накопиченні в суспензії до 16 г/л біомаси. Після отримання такої біомаси суспензію частково вливали, залишаючи 0,05-0,1 частину її робочого об'єму. В ферментер вносили свіже живильне середовище і процес повторювали, переводячи його з періодичного в об'ємно-доливний. При цьому лагфаза істотно скорочувалась, а в нас-

тупних циклах була практично відсутньою.

Слід відзначити, що з вугільних пластів шахт Донбасу видобуваються значні об'єми метану. Тільки на шахтах Макиївського регіону об'єм цього газу складає близько 314 тис. м³ на добу. Лише близько 20% його використовується в народному господарстві. Основна ж кількість (приблизно 157 тис. кг) щодобово викидається в атмосферу, забруднюючи її.

Нами показано, що на синтез 1 кг біомаси метанотрофні бактерії використовують 1,35 кг метану. Отже, при споживанні мікроорганізмами 50% метану від його загальної кількості, що видобувається дегазаційними устатковками шахт Макиївського регіону Донбасу, можна було б щодобово отримувати понад 58 тонн мікробної біомаси. Таким чином, метан вугільних пластів є доступною та цінною сировиною для одержання суспензії метанотрофних бактерій, яку можна використовувати для зниження концентрації CH₄ у вироблених просторах вугільних шахт, а також для приготування комбікормів.

Розроблено способи стабілізації фізіологічної активності метанотрофних бактерій в період часу, що передує їх біотехнологічному використанню. Встановлено, що найбільш помітна стабілізація метанокислювальної активності і чисельності життєдатних клітин *M. rubra* 15ш досягалась в суспензії, яка зберігалась при 4 °С у відсутності будь-яких газів. Зберігання метанотрофів в таких умовах на протязі 45 діб призводило до зниження цих показників, відповідно, на 11 та 24%. Дуже помітна стабілізація метанокислювальної активності бактерій та їх життєдатності спостерігалась при зберіганні суспензії в атмосфері метану чи гелію.

В той же час в атмосфері вуглекислоти або кисню відбувалась інтенсивна інактивація фізіологічної активності метанотрофів. Після 12 діб зберігання суспензії цих мікроорганізмів в атмосфері вуглекислоти, їх метанокислювальна активність і чисельність життєдатних клітин знижувались, відповідно, на 42 і 63%.

Зберігання бактерій при кімнатній температурі в атмосфері повітря супроводжується інтенсивним зниженням їх фізіологічної активності. Ступінь цього зниження зростає при збільшенні дос-

тупу повітря до популяції мікроорганізмів.

Обробка метанотрофних бактерій глинистим мінералом палігорськітом супроводжувалась зниженням інактивуючого впливу кисню повітря на метанокислювальну активність та життєздатність клітин при зберіганні суспензії в кімнатних умовах. В той же час високодисперсний діоксид кремнію-аеросил А-300 подібного впливу не спричиняв.

Таким чином, зберігання суспензії метанотрофних бактерій при низьких температурах у відсутності газів, в атмосфері метану, гелію або після попередньої обробки клітин глинистим мінералом палігорськітом дозволяє стабілізувати фізіологічну активність цих мікроорганізмів перед їх біотехнологічним використанням.

З метою визначення інтенсивності окислення метану бактеріями у вироблених просторах вугільних шахт, що відрізняються геотермічними умовами, елементним складом гірських порід та схемами розробки вугільних пластів, нами разом з співробітниками Інституту геотехнічної механіки АН України проведено комплекс шахтних експериментально-промислових робіт. Вони виконані у вироблених просторах 935-ї лави шахти ім. Ленінського комсомолу України (ЛКУ) виробничого об'єднання "Павлоград-вугілля" і 2-ї східної лави шахти ім. В. М. Важанова виробничого об'єднання "Макиїввугілля".

Мікробіологічну обробку гірських порід та залишків вугілля у вироблених просторах шахт здійснювали шляхом нанесення бактерій *Methylococcus capsulatus* на поверхню цих матеріалів. Біомасу мікроорганізмів транспортували з місця їх нарощування в герметичних емкостях в концентрованому вигляді і зберігали при 6°C, доставляючи її, при необхідності, на вугледобувну дільницю.

На шахті ім. ЛКУ в живильне середовище об'ємом 1,5 м³ вносили 40 л концентрованої суспензії метанотрофів, що забезпечувало вміст в 1 л приготовленої для використання суспензії 2,6 г клітин мікроорганізмів (в перерахунку на абсолютно суху біомасу). Цю суспензію періодично подавали через свердловини, що були пробурені в штреку, в розвантажувальну зону та на обвалені породи покривлі вугільного пласта. В результаті цього, на них закріплю

вались клітини метанотрофів і формувався бактеріальний фільтр в зоні виділення метану. Мікробіологічну обробку гірських порід в вироблених просторах цієї шахти провадили на протязі 30 діб. За цей час було використано 20 м³ суспензії, що містила 52 кг бактерій.

Ефективність застосування метанотрофних бактерій оцінювали за зниженням виділення метану з вироблених просторів в зонах витоку з них повітря. Якщо до обробки виробленого простору метанобагатість вугледобувної дільниці становила 25,2 м³/т, то в результаті життєдіяльності бактерій цей показник зменшувався до 13,22 м³/т (на 47%). Одержані результати свідчать про те, що вплив біофільтру поширюється на відстань до 60 м від вабою лави, а його максимальна активність спостерігалась за 25-40 м від лави і складала 0,06 м³/хвилину на метр погонний штреку.

Мікробіологічну обробку вироблених просторів шахти ім. В. М. Бажанова проводили на протязі шести діб. Живильне середовище в об'ємі одного кубометра готували на основі слабомінералізованої шахтної води, куди вносили 5,2 кг біомаси (в перерахунку на суху вагу). Для підвищення метаноокислювальної активності бактерій в приготовлену суспензію задавали 200 мг/л глинистого мінералу палигорськіту. Бактеріальну обробку вироблених просторів здійснювали шляхом зрошення гірських порід суспензією мікроорганізмів зі сторони лави.

Ефективність окислення метану бактеріями оцінювали на основі реєстрації його концентрації у "вікнах", які обладнували в бутових смугах для видалення метану з виробленого простору, на відкритих поверхнях бутової зони з боку лави, а також за зміною розходу метану в межах зони газовиділення з цього простору. Якщо до обробки виробленого простору у вміст метану на поверхні гірських порід на відстані трьох метрів від лави становив від 1,5 до 4,5%, то через 30 хвилин після нанесення суспензії в тих же місцях концентрація цього газу зменшувалась в середньому на 35% (рис. 11).

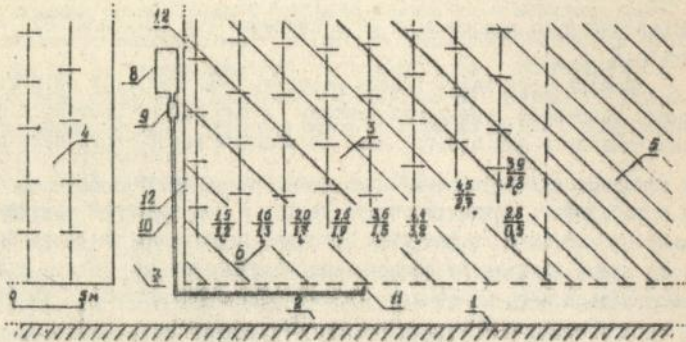


Рис. 11. Вплив мікробіологічної обробки виробленого простору 2-1 східної лави шахти ім. В. М. Бажанова на вміст в ньому метану. 1-вугільний пласт; 2-лава. 3-зона мікробіологічного фільтру; 4-бутова смуга; 5-зона обвалення гірських порід; 6-місця аналізу вмісту метану: чисельник-концентрація метану до мікробіологічної обробки; знаменник-після обробки; 7-вентиляційна виробка; 8-вагонетка для приготування суспензії мікроорганізмів; 9-насос для нагнітання суспензії бактерій; 10- з'єднующі шланги; 11-розпилувальна форсунка; 12-"вікна".

Особливо значним було зниження вмісту метану у "вікнах" вироблених просторів. До обробки порід суспензією мікроорганізмів концентрація метану у "вікнах" досягала 10%, а іноді і більш високих значень. Після кількох діб обробки вміст метану в газовій суміші, що надходила в цих "вікон", не перевищував 4%. Таким чином, в результаті мікробіологічної обробки виробленого простору шахти ім. В. М. Бажанова виділення метану в "вікон" було знижено в середньому на 63%. Максимальна активність бактерій досягала в зоні виробленого простору, що знаходилась на відстані 20 м від забою лави.

Аналізуючи інтенсивність окислення метану бактеріями у вироблених просторах двох шахт Донбасу, можна допустити, що

більш висока активність бактеріального фільтру на шахті ім. В. М. Бажанова, в першу чергу, обумовлена оптимальною температурою для життєдіяльності цих мікроорганізмів в даних просторах (40 °С). Можливо, що поряд з цим важливе значення мала обробка метанотрофних бактерій глинистим мінералом палигореськітом, який стимулює окислення метану даними мікроорганізмами.

Таким чином, застосування метанотрофних бактерій для окислення метану у вироблених просторах вугільних шахт дозволяє в значній мірі зменшити виділення цього газу в гірничі виробки і є перспективним методом підвищення безпеки праці в цих шахтах.

В И С Н О В К И

1. Метанотрофні бактерії широко поширені у водах газових вугільних шахт. Однак вони не справляють істотного впливу на вміст метану в атмосфері гірничих виробок. Ці мікроорганізми не виділяються з свіжооголених гірських масивів і не є аборигеною мікрофлорою вугільних шахт.

2. Життєдіяльність метанотрофних бактерій у водах вугільних шахт лімітується азот-та фосфорвмісними джерелами живлення, а також інгібується високими концентраціями іонів магнію, гідрокарбонатів та хлориду натрію (понад 10^2 , $5 \cdot 10^2$ і 10^4 мг/л, відповідно). Розроблено методи зниження в шахтних водах вмісту іонів магнію та гідрокарбонатів, що дозволяє використовувати ці води як основу для приготування живильного середовища при мікробіологічному зниженні метановиділення у вугільних шахтах.

3. Найбільш інтенсивний ріст і споживання метану суспензією бактерій відбувається при його вмісті в газовій суміші понад 40%. Оптимальна концентрація метану для його окислення іммобілізованими мікроорганізмами знаходиться в діапазоні від 30 до 60%.

4. Запропоновано концепцію оцінки потреб мікроорганізмів в компонентах живильного середовища через питомі концентрації субстратів. Визначені оптимальні для росту метанотрофів, лімітуючі та інгібуючі його питомі концентрації компонентів живильного середовища. Розроблена математична модель, що описує умови культивування мікроорганізмів в режимі укостату-шляхом

підтримання питомих концентрацій субстратів на рівні, оптимальному для росту популяції.

5. Ефективним способом підвищення інтенсивності росту метанотрофних бактерій і окислення ними метану є застосування в процесі їх культивування глинистих мінералів палигорськіту та монтморилоніту (100-500 мг/л), а також високодисперсного діоксиду кремнію.

6. В дисперсійних середовищах, що характеризуються нейтральними значеннями рН, поверхня метанотрофних бактерій та гірських порід має електронегативний заряд, що утруднює іммобілізацію цих бактерій на даних матеріалах. Величину дзета-потенціалу клітин запропоновано знижувати шляхом їх обробки дво- і тривалентними катіонами. При вмісті в середовищі 1 мг/л іонів алюмінію поверхня метанотрофних бактерій стає позитивно зарядженою.

7. Різні види метанотрофних бактерій істотно відрізняються гідрофобністю поверхні. Мікроорганізми, що використовують метан як джерело вуглецевого живлення, є більш гідрофобними, ніж ті, що ростуть на метанолі. Вони краще адгезуються до твердих матеріалів.

8. Гірська порода та кам'яне вугілля містять широкий спектр водорозчинних мінеральних речовин. Взаємодія живильного середовища з цими матеріалами призводить до зміни його складу, що викликає необхідність коригування в ньому вмісту мінеральних сполук в процесі мікробіологічної обробки вироблених просторів конкретної шахти.

9. При короткочасній взаємодії метанотрофних бактерій з твердими матеріалами (до 60 сек) на них закріплюється 26% клітин. Обробка цих мікроорганізмів іонами дво- і тривалентних металів, особливо алюмінію, а в деяких випадках глинистими мінералами, істотно збільшує адгезію клітин до твердих матеріалів. Іммобілізація метанотрофних бактерій на гірських породах супроводжується підвищенням інтенсивності окислення метану цими мікроорганізмами в 2 рази.

10. На підставі залежності активності споживання метану мікроорганізмами від температури інкубування, для зниження його концентрації у вироблених просторах вугільних шахт, розміщених на глибині 600-800 м, запропоновано застосовувати бактерії

Methylocystis parvus OВВР або *Methylomonas rubra* 15ш. У більш глибоких шахтах (температура 35-42⁰С) слід використовувати мікроорганізми *Methylococcus capsulatus* ЕСВ-874.

11. Розроблена, змонтована та введена в експлуатацію на шахті "Ясинівська-Глибока" ферментаційна установка. Показана можливість вирощування на ній суспензії метанотрофних бактерій при використанні в даному процесі метану, що видобувається в вугільних пластах. Цей метан запропоновано застосовувати як вуглецеву сировину для багатотоннажного виробництва мікробної біомаси.

12. Запропоновано способи стабілізації фізіологічної активності метанотрофних бактерій перед їх біотехнологічним застосуванням. Показано, що найбільш ефективним є зберігання суспензії цих мікроорганізмів при 4⁰С у відсутності газів, в атмосфері метану чи гелю, а також при взаємодії клітин з глинистим мінералом палигорськітом.

13. Розроблено прогноз інтенсивності окислення метану бактеріями у вироблених просторах вугільних шахт. Показано, що найбільш помітне його споживання буде відбуватися в зоні, що витягнута вздовж цих просторів і знаходиться на відстані 20-50 м від лави забоя. В процесі промислових випробувань біотехнології окислення CH_4 метанотрофними бактеріями у вироблених просторах двох шахт Донбасу його виділення з цих просторів було знижено більш ніж на 40%.

Список наукових праць, що опубліковані по темі дисертації:

1. Курдиш И. К., Мучник Ф. В. Эффективность ассимиляции углерода и кислорода чистой и ассоциативной культурой метилотрофов // Микроорганизмы-продуценты биологически активных веществ. Материалы II республ. конф. молодых ученых. - Киев: Наукова думка, 1974, -С. 35-36.

2. Малашенко Ю. Р., Романовская В. А., Богаченко В. Н., Курдиш И. К. Селекция термотолерантных и термофильных микроорганизмов, использующих газообразные углеводороды // Рефераты научно-исследовательских работ Института микробиологии и вирусологии

им. Д. К. Заболотного АН Украины (1973). - Киев: Наукова думка, 1975. - С. 19-20.

3. Курдиш І. К., Богаченко В. М., Малашенко Ю. Р. Вплив газового тиску на фізіологічний стан облигатних метанотрофів//Мікробіол. журн. -1975. -37, №5. -С. 584-589.

4. Курдиш І. К., Малашенко Ю. Р. Ріст метанокислюючих бактерій при рівному забезпеченні киснем//Мікробіол. журн. -1976. -38, №6. -С. 687-691.

5. Карпенко В. И., Курдиш И. К. Адсорбция метанокисляющих микроорганизмов на угле//Тез. докл. I республ. научно-теоретической конф. молодых ученых-микробиологов. -Ташкент: Изд-во "ФАН", 1976. -С. 30.

6. Хенкина Л. М., Курдиш И. К., Карпенко В. И. О возможности приготовления питательных сред на основе шахтных сточных вод при микробиологическом снижении метаноносности угля//Тез. докл. I республ. научно-теоретической конф. молодых ученых-микробиологов. -Ташкент: Изд-во "ФАН", 1976. -С. 30.

7. Курдиш И. К., Хенкина Л. М., Кожухарь Е. Н. Микробиологический метод снижения метаноносности угольных пластов//Тез. докл. I республ. научно-теоретической конф. молодых ученых-микробиологов. -Ташкент: Изд-во "ФАН", 1976. -С. 31.

8. Малашенко Ю. Р., Курдиш И. К., Романовская В. А. Методические вопросы применения метанокисляющих микроорганизмов для понижения метаноносности угольных пластов//Выбросы угля, породы и газа. -Киев: Наукова думка, 1977. -С. 152-157.

9. Абрамов Ф. А., Мякенький В. И., Швелев Г. А., Петух А. П., Малашенко Ю. Р., Курдиш И. К., Магкий Е. И. Создание блока ферментаторов для наращивания метанокисляющих микроорганизмов//Комплексные исследования физических свойств горных пород. Тез. докл. всесоюзной конф. М.: Изд-во МГИ, 1977. -С. 102.

10. Абрамов Ф. О., Малашенко Ю. Р., Мякенький В. И., Курдиш И. К., Швелев Г. А., Литвинов П. С., Волошин М. В. Життєздатність метанокислюючих бактерій після їх фільтрування крізь порові структури вугілля//Мікробіол. журн. -1977. -39, №3. -С. 290-293.

11. Курдиш І. К., Богаченко В. М. Шляхи стабілізації метанокислювальної активності та репродукції метанокислюючих бактерій//Мікробіол. журн. -1977. -39, №4. -С. 480.

12. Курдиш І. К., Хенкіна Л. М., Карпенко В. І., Бавина О. М. Використання шахтних стічних вод для культивування метанокислюючих бактерій//Мікробіол. журн. -1977. -39, N4. -С. 482.

13. Хенкіна Л. М., Курдиш І. К., Бавина О. М. Вплив мінеральних домішок вугілля на життєдіяльність метанокислюючих бактерій//Мікробіол. журн. -1977. -39, N4. -С. 511.

14. Курдиш І. К., Хенкіна Л. М., Євсєєв О. Ю., Криштаб Т. П., Малашенко Ю. Р. Вплив екстрактивних речовин вугілля на окислювальну і ростову активність метанокислюючих бактерій // Мікробіол. журн. -1977. -39, N5. -С. 591-596.

15. Курдиш І. К. Изучение метанокисляющих бактерий в условиях, моделирующих обстановку угольных шахт//Автореф. дисс. . . канд. биол. наук. -Киев. 1978. -21 с.

16. Абрамов Ф. А., Мякенький В. И., Швелев Г. А., Петух А. П., Литвинов П. С., Мяккий В. И., Курдиш И. К. Шахтный блок ферментаторов для получения биомассы метанокисляющих микроорганизмов//Информационное письмо ИГТМ АН УССР. -Днепропетровск. -1979. 4 с.

17. Курдиш И. К., Малашенко Ю. Р., Мякенький В. И., Петух А. П. Использование метанокисляющих бактерий для понижения метаноносности шахтных выработок//Тез. докл. V съезда Украинского микробиологического общества. Днепропетровск. -Киев: Наукова думка, 1980. -С. 75.

18. Курдиш И. К., Хенкина Л. М. Определение оптимальных концентраций источников минерального питания для метанокисляющих бактерий//Тез. докл. VI съезда Всесоюзного микробиологического общества. -Рига. -1980. -С. 116.

19. Курдиш И. К., Хенкина Л. М., Бавина Е. Н., Малашенко Ю. Р. Шахтные сточные воды как основа питательной среды для метанокисляющих бактерий при микробиологическом методе понижения метаноносности угля//Мікробіол. журн. -1980. -42, N4. -С. 420-427.

20. Петух А. П., Мякенький В. И., Малашенко Ю. Р., Курдиш И. К., Мяккий В. И. Результаты опытно-промчленной проверки шахтного блока ферментаторов для наращивания биомассы метанокисляющих микроорганизмов//Техника безопасности, охрана труда и горно-спасательное дело. -1980. -N4. -С. 9-11.

21. Курдиш И. К., Хенкина Л. М., Малашенко Ю. Р. Теоретический анализ эффективности бактериального окисления метана в уголь-

ных шахтах//Микробиол. журн. -1982. -44, N5. -С. 36-40.

22. Курдиш И. К. Эффективность снабжения метанооксиляющих бактерий кислородом при микробиологическом понижении метаносности угольных пластов//Микробиол. пром-сть. -1982. N6. Деп. N118. -5 с.

23. Курдиш И. К., Чернышенко Д. В., Шурова З. П., Малашенко Ю. Р. Выращивание метанооксиляющих бактерий на метане, извлекаемом из угольных пластов//Микробиол. журн. -1983. -45, N3. -С. 27-31.

24. Курдиш И. К., Оксак С. Ф., Сусло А. И. Метан угольных шахт как углеродное сырье для получения микробного белка//Микробиологическая пром-сть. -1983. -N6. -С. 15-16.

25. Карпенко В. И., Курдиш И. К., Малашенко Ю. Р. Иммуобилизация клеток метанооксиляющих бактерий на угле//Микробиол. журн. -1983. -45, N5. -С. 32-36.

26. Малашенко Ю. Р., Курдиш И. К. Критерии оценки трофических потребностей микроорганизмов-удельные концентрации питательных веществ//Тез. докл. IV симпозиума социалистических стран по биотехнологии. -Варна. -1986.

27. Курдиш И. К., Хенкина Л. М., Малашенко Ю. Р. Влияние минеральных компонентов питательной среды на рост метанооксиляющих бактерий//Микробиол. журн. -1987. -49, N1. -С. 35-40.

28. Курдиш И. К., Хенкина Л. М., Малашенко Ю. Р. К оценке влияния компонентов среды на рост микроорганизмов//Управляемое культивирование микроорганизмов. Тез. докл. IV Всесоюз. конф. Пушкино. -1986.

29. Malashenko Yu. R., Kurdish I. K., Michnik F. V. Supporting of intensive microbial growth by optimal specific concentrations of substrate//Continuous culture in biotechnology and environment conservation. 19-20 Juli. 1987. Hradec Kralove, Czechoslovakia. -1987.

30. Курдиш И. К., Мучник Ф. В., Малашенко Ю. Р., Дементьева О. А. Удельные концентрации питательных веществ как критерий управления процессом культивирования микроорганизмов//Микробиол. журн. -1988. -50, N4. -С. 13-16.

31. Курдиш И. К., Карпенко В. И., Кравчук В. Н., Егоров О. В., Малашенко Ю. Р. Метаноокислительная активность бактерий, иммобилизованных на горных породах//Инженерная энзимология. Материалы VI

Всесоюзн. симпозиума. - Вильнюс. - 1988. - С. 174.

32. Курдиш И. К. Удельные концентрации компонентов среды как критерий управления микробиологическими процессами // Тез. докл. VII съезда Украинского микробиологического общества. - Черновцы: Наукова думка, 1989. - С. 117-118.

33. Курдиш И. К. Состояние и перспективы микробиологического метода окисления метана в угольных шахтах // Препринт N1. ИМВ АН УССР. - Киев. - 1989. - 19 с.

34. Kurdish I. K., Muchnik F. V., Malashenko Yu. R. The mathematical method to control the microbial cultivation process by specostat principle // Abstr. Intern. Symp. Interbiotech' 89. Bratislava. - 1989. - P. 123.

35. Гордиенко А. С., Курдиш И. К. Электрокинетические свойства клеток *Methylomonas rubra* и их взаимодействие с дисперсными материалами // Микробиол. журн. - 1990. - 52, N4. - С. 88-92.

36. Курдиш И. К., Кравчук В. Н., Егоров О. В., Карпенко В. И., Малашенко Ю. Р. Адапция метанотрофных бактерий к горным породам угольных шахт // Микробиол. журн. - 1990. - 52, N1. - С. 73-77.

37. Kurdish I. K., Muchnik F. V., Malashenko Yu. R. The mathematical method to control the microbial cultivation process by specostat principle // Mathematical Modelling in Biotechnology. Progress in Biotechnology. N 6. Proc. Intern. Symp. Interbiotech' 89. Eds. Blazei A., Ottova A. - Amsterdam etc.: Elsevier, 1990. - P. 175-182.

38. Курдиш И. К., Кигель Н. Ф., Егоров О. В. Физиологическая активность метанотрофных бактерий при их взаимодействии с горными породами // Микробиол. журн. - 1991. - 53, N1. - С. 92-98.

39. Курдиш И. К., Цимберг Е. А., Титова, Л. В., Подгорский В. С., Чуйко А. А., Андрейж Е. И., Антипчук А. Ф. Способ культивирования микроорганизмов. - Авт. свид. СССР N1659482, 1991.

40. Мяненький В. И., Демченко В. В., Калининко В. Н., Петух А. П., Шмиголь А. В., Курдиш И. К., Гордиенко А. С., Кигель Н. Ф. Способ дегазации выработанного пространства лавы. Авт. свид. СССР N 1696739, 1991.

41. Мяненький В. И., Курдиш И. К. Микробиологическое окисление метана угольных шахт - Киев: Наукова думка, 1991. - 146 с.

42. Курдиш И. К. Роль метанотрофных бактерий шахтных вод в

формировании атмосферы горных выработок//Микробиология охраны биосферы в регионах Урала и Северного Прикаспия. Тез. докл. Оренбург. -1991. -С. 68-69.

43. Кигель Н. Ф., Курдиш И. К. Биотехнологические аспекты микробиологического снижения концентрации метана в выработанных пространствах угольных шахт//Микробиология охраны биосферы в регионах Урала и Северного Прикаспия. Тез. докл. Оренбург. -1991. -С. 54-55.

44. Курдиш И. К., Кигель Н. Ф. Влияние глинистого минерала палыгорскита на физиологическую активность и адгезию метанотрофных бактерий //Микробиол. журн. -1992. -54, N1. -С. 73-78.

45. Курдиш И. К., Мякенький В. И., Демченко В. Б., Кигель Н. Ф., Артемов К. В., Трунов Л. Ф. Прогноз интенсивности микробиологического окисления метана в выработанных пространствах угольных шахт//Микробиол. журн. -1992. -54, N3. -С. 66-74.

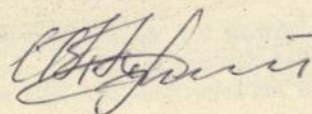
46. Мякенький В. И., Курдиш И. К., Демченко В. Б., Петух А. П., Шмиголь А. В., Трунов Л. Ф. Эффективность микробиологического окисления метана в выработанных пространствах угольных шахт//Микробиол. журн. -1992. -54, N1. -С. 67-73.

47. Курдиш И. К. Оценка роли метанооксиляющей микрофлоры сточных вод угольных шахт в формировании атмосферы горных выработок//Микробиол. журн. -1992. -54, N4. -С. 76-81.

48. Мякенький В. И., Курдиш И. К., Ивацов М. В., Демченко В. Б., Петух А. П. Способ дегазации выработанного пространства лавы. Положительное решение ВНИИГЭП от 13. 03. 1992.

49. Курдиш И. К., Кигель Н. Ф., Бортник С. Ф. Стабилизация физиологической активности метанотрофа *Methylomonas rubra* 15ш при хранении//Микробиол. журн. -1993. -55, N4. -С. 37-43.

50. Gordienko A. S., Zbanatskaya I. V., Kurdish I. K. Change in electrosurface properties of *Methylomonas rubra* cells at contact interaction with the particles of silicon dioxide//Can. J. Microbiol. -1993. -N9.



УБЕНТЗ, 1993, зам. 658, тир. 100

AB 28.499