## Введение

Метанобразующие бактерии - строгие анаэробы, самая большая группа архей из филума Euryarchaeota , и представляют собой уникальный объект для микробиологических, биохимических, молекулярно-генетических и биотехнологических исследований. Обычно метаногены являются конечным звеном анаэробной пищевой цепи разложения биологических полимеров и выделяют биогаз в качестве конечного продукта(60% CH4 +40% CO2). Биогаз образуется на дне озер и болот, поднимаясь вверх, попадает в аэробную зону и используется метанокислящими бактериями. Метан образуется также в рубце жвачных (корова выделяет до 200 л метана в день) и в кишечнике термитов.

Особый интерес представляют термофильные метаногены, поскольку они обладают высокими скоростями роста, способны осуществлять интенсивный процесс метаногенеза и в связи с этим, рассматриваются в настоящий момент в качестве наиболее перспективных объектов для использования в биотехнологии. Термофильные метанобразующие бактерии родов Methanobacterium и Methanosarcina являются основными компонентами термофильного анаэробного сообщества микроорганизмов, осуществляющего деструкцию органического вещества до метана. Таким образом, особую актуальность приобретает выделение новых термофильных организмов родов Methanobacterium и Methanosarcina и изучение их морфологии, ультраструктуры, физиологических свойств и таксономического положения [4].

## 1. Систематическое положение

Для создания таксономической структуры метанобразующих бактерий был использован филогенетический подход, основанный на сравнительном анализе нуклеотидных последовательностей 16S рРНК. В соответствии с таким подходом в IX издании Определителя бактерий Берджи группа разделена на три порядка (Methanobacteriales, Methanococcales, Methanomicrobiales), коэффициент сходства (SAB) для которых составляет 0,2 - 0,28. Далее порядки разделены на 6 семейств (SAB = 0,34-0,36) и 13 родов (SAB = 0,46-0,51). Число видов достигает более 40. SAB для них колеблется в пределах 0,55-0,65. О гетерогенности группы можно судить и по нуклеотидному составу ДНК ее представителей (молярное содержание ГЦ-оснований - от 27 до 61%).

· Надцарство: Procaryota

· Домен: Archaea

· Тип: Euryarchaeota

· Группа: Methanogenes (группа 31)

· Подгруппы:

· Порядок 1 (Methanobacteriales):

· Род: Methanobacterium, Methanobrevibacter, Methanosphaera, Methanothermus

· Порядок 2 (Methanomicrobiales):

· Род: Methanococcus, Methanocorpusculum, Methanoculleus, Methanogenium, Methanomicrobium, Methanospirillium, Methanoplanus

· Порядок 3 (Methanococcales):

· Род: Methanococcoides, Methanosarcina, Methanothrix, Methanohalobium, Methanohalophilus [5].

## 2. Морфология

Архебактерии, группа микроскопических одноклеточных организмов; относятся к «доядерным» формам - прокариотам. Сходны с истинными бактериями по размерам клеток и морфологическим признакам, однако состав и строение клеточных стенок, структура генетического аппарата и другие особенности сближают их с эукариотами. Описано более 100 видов. Большинство археев живёт в экстремальных условиях, часто непригодных для жизни других организмов, - в насыщенных растворах солей (галобактерии), при температуре 80ºC и выше (гипертермофилы), в кислой среде (pH 1-2, термоплазмы) и т. д. Только среди археев есть метаногены - организмы, способные выделять газ метан. Археи, как и бактерии, относятся к наиболее древним обитателям Земли.

Метанобразующие бактерии (метаногены) - морфологически разнообразная группа, объединяемая двумя общими для всех представителей признаками: облигатным анаэробиозом и способностью образовывать метан. Морфологически метаногены очень разнообразны: среди них есть палочки Methanobacterium с клеточной стенкой из псевдомуреина, кокки Methanococcus с белковой клеточной стенкой, плоские угловатые формы Methanohalobium, псевдопаренхиматозные агрегаты Methanosarcina с гетерополисахаридом, цепи палочек в трубчатых чехлах Methanothrix (Methanosaeta) и спириллы Methanospirillum с белковой клеточной стенкой. В таксономии метаногенов употребляется обозначение Methano-, в отличие от аэробных метанокисляющих метанотрофов Methylo-; словосочетание «метановые бактерии», хотя и должно относиться только к метанобразующим, может быть неправильно понято. У некоторых видов наблюдается тенденция формировать нити или пакеты. Клетки неподвижны или передвигаются с помощью перетрихиально или полярно расположенных жгутиков. Жгутики состоят из одной или нескольких фибрилл, не окружены мембраной. Грамположительные или грамотрицательные (Окраска по Граму неопределенная, так как пептидогликан в стенке отсутствует). Споры в чистых культурах не обнаружены. Так, например, род Methanobacterium - неспорообразующие палочки, изогнутые или прямые, от длинных и нитевидных до кокковидных, шириной около 0,5-1,0мкм, от грамположительных до грамотрицательных, неподвижные или же подвижные с монотрихальными полярными жгутиками. А род Methanosarcina - крупные сферические клетки 1,5-2,5мкм в диаметре, образуют правильные пакеты, от грамвариабельных до грамположительных, неподвижные.

ЭПС, аппарат Гольджи, лизосомы, митохондрии, пластиды (хлоропласты) отсутствуют. Имеются органеллы, окружённые однослойной белковой мембраной (хлоросомы, магнитосомы, карбоксисомы, фикобилисомы) У представителей рода Methanosarcina в клетках найдены газовые вакуоли. Размер цитоплазматических рибосом 70 S. Дыхательная система является частью клеточной мембраны или мезосом. Для некоторых метаногенов характерна развитая система внутриклеточных элементарных мембран, являющихся результатом разрастания и впячивания цитоплазму ЦПМ и сохраняющих с ней связь. У этой группы архебактерий обнаружены клеточные стенки трех видов: состоящие из псевдомуреина, построенные из белковых глобул и гетерополисахаридной природы.

Клеточная оболочка термофильных метаногенов обладает заметной устойчивостью к действию температур (за счет входящих в её состав: термостабильных белков, большого количества липидов и преобладанию жирных кислот с более длинными и разветвленными цепочками, которые способны придавать большую упругость мембранной структуре). Примерно 20-30% мембранных липидов метаногенов представлены нейтральными и 70-80%- полярными липидами. Последние - это в основном два типа простых эфиров глицерина и терпеноидных спиртов, на основе которых образуются полярные фосфо- и гликолипиды. В зависимости от вида клеточные мембраны могут содержать оба типа эфиров или только один. Основными нейтральными липидами являютя С20-,С25- и С30- ацилоклические изопреноидные углеводороды, насыщенные или содержащие двойные связи. Запасных продуктов в виде поли- β-оксимасляной кислоты или гликогена в клетках не обнаружено.

Метаногены имеют одиночную кольцевую хромосому <http://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A5%D1%80%D0%BE%D0%BC%D0%BE%D1%81%D0%BE%D0%BC%D0%B0>, размер которой может достигать 5751492 пар нуклеотидов <http://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9D%D1%83%D0%BA%D0%BB%D0%B5%D0%BE%D1%82%D0%B8%D0%B4> у Methanosarcina acetivorans <http://ru.wikipedia.org/wiki/Methanosarcina\_acetivorans>, обладающей самым большим известным геномом <http://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%93%D0%B5%D0%BD%D0%BE%D0%BC> среди архей. Но, как правило, они имеют маленький геном, но их не относят к примитивным формам (до сих пор у них не получено, ни одного мутанта). Это высоко специализированные организмы, обладающие особыми метаболическими системами, определяющими их уникальный стиль жизни. ДНК ( хромосома ) не имеет гистонов и высших структур [2].

## 3. Особенности жизнедеятельности

### 3.1 Питание

термофильный метанобразующий бактерия энергетический

Метанобразующие археи - строгие анаэробы. Первые исследования чистых культур, выделенных из рубца жвачных животных, показали, что рост их возможен при начальном окислительно-восстановительном потенциале среды ниже - 300 мВ. Рост некоторых видов полностью подавляется при содержании в газовой фазе более 0,004% молекулярного кислорода. В последнее время, однако, описаны виды с относительно низкой чувствительностью к O2. В их клетках найдена супероксиддисмутаза. Возможно, в природе такие виды могут сохранять жизнеспособность при кратковременных контактах с O2 и возобновлять рост в анаэробных условиях. В качестве источника углерода и энергии для роста метаногены используют узкий круг соединений. Наиболее универсальными источниками углерода и энергии для них является газовая смесь H2 и CO2. Более 3/4 известных видов утилизируют H2 + CO2. Некоторые метаногены приспособились к облигатному использованию этих соединений. Следующими по распространенности источниками углерода и энергии служат формиат, ацетат, метанол, метиламины и моноокись углерода.

Около половины изученных видов не нуждаются в каких-либо органических соединениях. Для роста многих культур в атмосфере H2 и CO2 требуется внесение в среду органических веществ, стимулирующих рост или абсолютно для него необходимых. Это могут быть некоторые витамины группы B, ацетат, пируват, сукцинат, отдельные аминокислоты, дрожжевой экстракт или компоненты неизвестного состава, содержащиеся в природных средах обитания. Так, штаммы, выделенные из рубца жвачных животных, нуждаются в добавках рубцовой жидкости. Сложные органические соединения метанобразующие бактерии использовать не могут. В качестве источника азота метаногены используют аммонийный азот или некоторые аминокислоты. Для ряда видов показана способность к азотфиксации. Источником серы могут служить сульфаты, сульфид или серосодержащие аминокислоты [2].

### 3.2 Дыхание

Именно из-за высокой чувствительности метаногенов к кислороду сведения об их физиологии пока сравнительно скудны. Только после разработки специальных методов (например, метода Хангейта) появилась возможность пересевать и выделять метанобразующие бактерии без доступа кислорода

Конструктивный метаболизм

Большинство известных метаногенов способны расти хемолитоавтотрофно <http://www.medbiol.ru/medbiol/microbiol/0011e787.htm> на смеси СО2+Н2 в качестве единственного источника углерода и энергии. Энергию получают, осуществляя следующую реакцию:

Н2 + СО2 переходит в СН4 + 2Н2О

Как видно из этого уравнения, СО2 служит не только единственным источником углерода, но и конечным акцептором электронов при окислении Н2. Около 90% использованной СО2 восстанавливается до СН4, что сопровождается синтезом АТФ <http://www.medbiol.ru/medbiol/cytology/00158711.htm> , и только 10% или меньше включается в вещества клеток.

Фиксация СО2 у автотрофных <http://www.medbiol.ru/medbiol/microbiol/00015018.htm> метаногенов происходит по нециклическому ацетил - КоA- пути <http://www.medbiol.ru/medbiol/microbiol/00028410.htm>, функционирующему и у ацетогенных эубактерий <http://www.medbiol.ru/medbiol/microbiol/0002858e.htm> ( рис. 1 <http://www.medbiol.ru/medbiol/microbiol/000e329a.htm>). Ключевым промежуточным соединением этого пути является ацетил - КоA <http://www.medbiol.ru/medbiol/botanica/0010f3ab.htm> , синтезируемый из двух молекул СО2. Метильная и карбоксильная группы молекулы образуются разными путями. Метильная группа возникает при восстановлении молекулы СО2 до уровня метанола <http://www.medbiol.ru/medbiol/microbiol/000864f4.htm> , оставаясь при этом всегда связанной с переносчиком. Карбоксильная группа появляется в результате восстановления второй молекулы СО2 до СО, катализируемого СО-дегидрогеназой. Метильные и карбоксильные группы связываются в реакциях трансметилирования и транскарбоксилирования с образованием активированной уксусной кислоты <http://www.medbiol.ru/medbiol/biochem/reactions/0000428a.htm>. Процесс осуществляется при участии уникальных ферментов. Из ацетил-КоA в результате восстановительного карбоксилирования <http://www.medbiol.ru/medbiol/microbiol/0006a0a3.htm> образуется пируват <http://www.medbiol.ru/medbiol/biochem/x0016eee.htm> и далее фосфоенолпировиноградная <http://www.medbiol.ru/medbiol/microbiol/0010f36e.htm> и щавелевоуксусная кислоты <http://www.medbiol.ru/medbiol/microbiol/0012e8f0.htm> , которые служат предшественниками аминокислот и сахаров. Пути фиксации СО2 ацетогенными эубактериями <http://www.medbiol.ru/medbiol/microbiol/0002858e.htm> и метаногенными архебактериями различаются коферментами и некоторыми частными реакциями.

Экзогенный ацетат <http://www.medbiol.ru/medbiol/biochem/reactions/0000428a.htm> в конструктивный метаболизм включается через ацетил-КоA и далее в серии реакций, функционирующих в восстановительном ЦТК <http://www.medbiol.ru/medbiol/microbiol/00043974.htm>. Замкнутости цикла препятствует отсутствие изоцитратдегидрогеназы.



Рис. 1. Схема начальных этапов метаболизма [4].

Примечание: CO2 у Methanobacterium thermoautotrophicum: X1-COOH - карбоксипроизводное; X1-CHO - формилпроизводное; X2-CH2 - метиленпроизводное; X2-CH3 - метилпроизводное; Ф1 - метилредуктазная система; Ф2 - CO-дегидрогеназа; ФЕП - фосфоенолпировиноградная кислота; ФГК - фосфоглицериновая кислота; ФГА - фосфоглицериновый альдегид; Ф-6-Ф - фруктозо-6-фосфат; ЩУК - щавелевоуксусная кислота; КоМ-S-CH3 - метилкофермент М

Биосинтез метана Восстановление CO2 до CH4 требует переноса 8 электронов. Образующиеся на этом пути промежуточные продукты находятся не в свободном состоянии, а остаются связанными с переносчиками. Согласно предложенной модели на первом этапе CO2 связывается с переносчиком углерода, образуя карбоксипроизводное (X1-COOH), которое восстанавливается до формилпроизводного (X1-CHO). Второй этап метаногенеза включает перенос формильной группы на другой переносчик (Х2), который проводит C1-группу через две последовательные восстановительные реакции, приводящие к образованию метилпроизводного (X2-CH3). На уровне образования метиленпроизводного (X2-CH2) в процесс метаногенеза включается экзогенный формальдегид. Соединения, содержащие метильные группы (CH3OH, CH3COOH, CH3NH2 и другие метиламины), подключаются на уровне метилпроизводного. В этой же точке происходит разветвление анаболических и катаболических путей. Функция X2 у метаногенов напоминает функцию тетрагидрофолата у ацетогенных эубактерий.

На третьем конечном этапе метаногенеза, наиболее изученном, метильные группы с переносчика поступают на кофермент М (КоМ-SH). Образуется метил-КоМ. Далее следует его восстановление, сопровождающееся распадом комплекса и выделением CH4. Обе реакции катализируются метилредуктазной системой, представляющей сложный мультиферментный комплекс, в состав которого помимо фермента входят кофермент М, фактор F430. Для активности системы необходимы АТФ, ионы Mg2+ и еще не идентифицированные кофакторы [2].

Кофакторы У метаногенов обнаружено около 12 необычных кофакторов, участвующих в первичном метаболизме углерода и водорода.

Кофермент М - 2-меркаптоэтансульфоновая кислота:



Наиболее просто устроенный из известных коферментов. Переносчик и донор метильных групп. Служит субстратом для метилредуктазной системы, катализирующей восстановление метил-КоМ до CH4.

Фактор F420 - производное 5-деазафлавина (рис.2, А <http://evolution.powernet.ru/library/micro/18.html>). В окисленном состоянии при нейтральном и щелочном значении pH имеет характерный максимум поглощения при 420 нм. Переносчик электронов с низким окислительно-восстановительным потенциалом (-380 мВ). Вероятно, выполняет функцию акцептора электронов от гидрогеназы.

Фактор F430 - никельсодержащий тетрапиррол (рис.2, Б <http://evolution.powernet.ru/library/micro/18.html>); компонент метилредуктазной системы, участвует в восстановлении метильной группы метил-КоМ до CH4.

Метаноптерин (рис.2, В <http://evolution.powernet.ru/library/micro/18.html>) участвует в переносе C1-групп в процессе восстановления CO2 до CH4 на уровне метенил-, метилен- и метилпроизводных.

Метанофуран (рис.2, Г <http://evolution.powernet.ru/library/micro/18.html>) также участвует в переносе C1-групп в процессе восстановления CO2 до CH4.

Фактор FB необходим для функционирования метилредуктазной системы. Структура пока не установлена.



Рис. 2. Коферменты и простетические группы метанобразующих архебактерий [4].

Примечание: А - фактор F420; Б - фактор F430; В - метаноптерин; Г - метанофуран; R1-3 - различные боковые цепи

Определенная роль в процессе метаногенеза принадлежит корриноидам - производным аналогов витамина B12. Их функции связаны с переносом метильных групп. Считают, что метаногены могут при определенных условиях образовывать активные B12-зависимые метилтрансферазы, участвующие в синтезе метана.

Энергетические процессы.

Как отмечалось выше, почти все метанобразующие бактерии могут получать энергию за счет окисления H2, сопряженного с восстановлением CO2. Опытами с меченым водородом показано, что H2 в этом процессе служит только донором электронов, а источником протонов в молекуле метана является вода.

Многие виды для получения энергии могут использовать формиат:

HCOOH = CH4 + ЗCO2 + 2H2O.

Для некоторых представителей показана способность образовывать метан при использовании метанола:

CH3OH = ЗCH4 + CO2 + 2H2O

а также метилированных аминов.

У ряда метаногенов обнаружена способность окислять окись углерода, что также сопровождается синтезом метана:

CO + 2H2O = CH4 + ЗCO2.

Таким образом, акцепторами электронов (а в ряде случаев и донорами, и акцепторами) у метанобразующих бактерий является ряд одноуглеродных соединений (CO2, CO, формиат, метанол, метилированные амины) и единственное двухуглеродное соединение - ацетат.

Механизм энергетических процессов метаногенов еще не расшифрован, но общие принципиальные положения установлены. Ясно, что получение энергии, по крайней мере при окислении H2, сопряженном с восстановлением CO2, связано с функционированием электронтранспортной системы, включающей дегидрогеназы, переносчики электронов и редуктазы, т. е. определенным видом анаэробного дыхания.

Перенос электронов приводит к образованию трансмембранного протонного градиента, разрядка которого с помощью мембранной АТФ-синтазы сопровождается синтезом АТФ. Доказательством получения метанобразующими бактериями энергии в результате окислительного фосфорилирования служит подавление у них образования АТФ при действии разобщителей и ингибиторов АТФазы. Мало, однако, известно об электронных переносчиках. Не изучена организация дыхательной цепи и ее H+-переносящих участков. В качестве дегидрогеназ идентифицированы гидрогеназа и формиатдегидрогеназа. От H2 перенос электронов катализируется связанной с мембраной гидрогеназой, с которой они акцептируются фактором F420. С последнего электроны поступают на НАДФ+. Вероятно, и восстановленный фактор F420 и НАДФ-H2 служат донорами электронов для восстановительных превращений C1-групп у метаногенов. Окисление формиата также сопряжено с восстановлением фактора F420 и последующим образованием НАДФ-H2.

Долгое время считали, что у метанобразующих бактерий нет электронных переносчиков, типичных для эубактерий, имеющих электронтранспортные цепи. Недавно у Methanosarcina barken найдены ферредоксин Fe3S3-типа и цитохромы типа b и c. Последние обнаружены также у других видов, способных использовать в качестве энергетических субстратов соединения, содержащие метильные группы. У метаногенов, растущих только на среде, содержащей смесь H2 + CO2 или формиат, цитохромы не найдены. Из хинонов обнаружены g- и a-токоферохиноны; менахинонов нет. Терминальные этапы катализируются соответствующими редуктазами, из которых наиболее изучена метилредуктазная система. Реакция, катализируемая метилредуктазой, является общей при образовании метана из различных субстратов (CO2, CO, метанол, ацетат), и именно с ней связано получение клеткой энергии. Фермент локализован в мембране, и его функционирование приводит к трансмембранному перемещению протонов. На 1 молекулу образованного метана приходятся 4 транслоцированных H+.

Открыта способность метанобразующих бактерий использовать в качестве конечного акцептора электронов вместо CO2 молекулярную серу. В присутствии S0 и обычных энергетических субстратов (H2 или метанол) наблюдается образование значительного количества H2S при одновременном снижении в 2-10 раз синтеза CH4. Таким образом, метанобразующие бактерии способны осуществлять энергетический метаболизм хемолито- или хемоорганотрофного типа, сочетая его с конструктивным обменом авто- или гетеротрофного типа [5].

### 3.3 Размножение

Размножаются метаногены очень медленно и проявляют повышенную чувствительность к изменениям окружающей среды. Как и все археи, метаногены размножаются бесполым путём <http://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%91%D0%B5%D1%81%D0%BF%D0%BE%D0%BB%D0%BE%D0%B5\_%D1%80%D0%B0%D0%B7%D0%BC%D0%BD%D0%BE%D0%B6%D0%B5%D0%BD%D0%B8%D0%B5>: бинарным <http://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%94%D0%B5%D0%BB%D0%B5%D0%BD%D0%B8%D0%B5\_%D0%BF%D1%80%D0%BE%D0%BA%D0%B0%D1%80%D0%B8%D0%BE%D1%82%D0%B8%D1%87%D0%B5%D1%81%D0%BA%D0%B8%D1%85\_%D0%BA%D0%BB%D0%B5%D1%82%D0%BE%D0%BA> или множественным делением, фрагментацией <http://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A4%D1%80%D0%B0%D0%B3%D0%BC%D0%B5%D0%BD%D1%82%D0%B0%D1%86%D0%B8%D1%8F\_%28%D1%80%D0%B0%D0%B7%D0%BC%D0%BD%D0%BE%D0%B6%D0%B5%D0%BD%D0%B8%D0%B5%29> или почкованием <http://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9F%D0%BE%D1%87%D0%BA%D0%BE%D0%B2%D0%B0%D0%BD%D0%B8%D0%B5>. Мейоза <http://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9C%D0%B5%D0%B9%D0%BE%D0%B7> не происходит, поэтому даже если представители конкретного вида архей существуют более чем в одной форме, все они имеют одинаковый генетический материал. Клеточное деление <http://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%94%D0%B5%D0%BB%D0%B5%D0%BD%D0%B8%D0%B5\_%D0%BA%D0%BB%D0%B5%D1%82%D0%BA%D0%B8> определяется клеточным циклом <http://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9A%D0%BB%D0%B5%D1%82%D0%BE%D1%87%D0%BD%D1%8B%D0%B9\_%D1%86%D0%B8%D0%BA%D0%BB>: после того, как хромосома реплицировалась и две дочерние хромосомы разошлись, клетка делится. Репликация <http://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A0%D0%B5%D0%BF%D0%BB%D0%B8%D0%BA%D0%B0%D1%86%D0%B8%D1%8F\_%28%D0%B1%D0%B8%D0%BE%D0%BB%D0%BE%D0%B3%D0%B8%D1%8F%29> хромосом начинается с множественных точек начала репликации <http://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A2%D0%BE%D1%87%D0%BA%D0%B0\_%D0%BD%D0%B0%D1%87%D0%B0%D0%BB%D0%B0\_%D1%80%D0%B5%D0%BF%D0%BB%D0%B8%D0%BA%D0%B0%D1%86%D0%B8%D0%B8> с помощью ДНК-полимеразы <http://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%94%D0%9D%D0%9A-%D0%BF%D0%BE%D0%BB%D0%B8%D0%BC%D0%B5%D1%80%D0%B0%D0%B7%D0%B0>, похожей на аналогичные ферменты эукариот. Однако белки, управляющие клеточным делением, такие как FtsZ, которые формируют сжимающее кольцо вокруг клетки, и компоненты септы, проходящей через центр клетки, схожи с их бактериальными эквивалентами [2].

## 4. Экология микроорганизмов

### 4.1 Влияние факторов окружающей среды

Влажная среда Для того, чтобы бактерии, необходимые для получения биогаза <http://www.rosbiogas.ru/tehnologija-poluchenija-biogaza.html> могли хорошо работать в таком многоступенчатом анаэробном процессе, для них нужно создать определенные подходящие жизненные условия.

Метановые бактерии способны жить и размножаться в том случае, когда субстраты растворены в воде в достаточной мере (в составе субстрата должно быть минимум 50% воды). Основным отличием их от аэробных бактерий является то, что они не могут долго существовать в твердой фазе. По этой причине для так называемых технологий получения биогаза <http://www.rosbiogas.ru/tehnologija-poluchenija-biogaza.html> из твердых субстратов есть необходимость в небольшом увлажнении материала, хотя вначале процесса совершенно несущественно, является ли используемый субстрат изначально влажным или же стал таковым путем орошения или смешивания.

Исключение проникновения воздуха

В анаэробном процессе расщепления органических субстратов принимает участие целый ряд микроорганизмов. Около 50% участвующих бактерий являются аэробными или факультативно аэробными и требуют либо хорошо переносят кислород. Только метановые бактерии являются исключительно анаэробными. Если в субстрате еще присутствует кислород, как, например, в свежем навозе, то аэробные бактерии в первую очередь используют его. Это происходит на первом этапе процесса образования биогаза <http://www.rosbiogas.ru/>. Поэтому небольшое количество кислорода, который проникает при целенаправленном нагнетании воздуха для очистки от серы или же при открывании смотровых отверстий, не является вредным.

Намного значительнее окислительно-восстановительный потенциал. Окислительно-восстановительный потенциал представляет собой степень готовности ионов принимать электроны. Для роста анаэробных бактерий этот потенциал должен находиться на очень низком уровне (-0,1У). Поскольку кислород имеет высокий окислительно-восстановительный потенциал (+1,78), то это вначале вредит анаэробным бактериям. Однако если имеется достаточно веществ с низким окислительно-восстановительным потенциалом, то анаэробный процесс может происходить и в присутствии кислорода.

Исключение попадания света

Свет тоже является немаловажной частью жизнедеятельности метановых бактерий. Хотя свет и не является для бактерий смертельным, он замедляет процесс. Исключить влияние света на процесс на практике можно с помощью светонепроницаемой крышки.

Равномерная температура

Метановые бактерии проявляют свою жизнедеятельность в пределах температуры 0-70°С. При минусовой температуре они выживают, но прекращают свою жизнедеятельность. В литературе как нижнюю границу температуры указывают 34°С.

Скорость процесса брожения очень зависит от температуры. Принципиально важным является: чем выше температура, тем быстрее происходит разложение и тем выше производство газа. Таким образом сокращается время разложения (рис.3).



Рис.3: Влияние температуры брожения и времени брожения на количество произведенного газа [3].

При возрастании температуры снижается содержание метана в биогазе. Это связано с тем, что при высоких температурах растворенная в субстрате двуокись углерода интенсивнее переходит в газовидную фазу (в биогаз), таким образом, что относительное содержание метана сокращается. Количество газа, которое можно добыть будет одинаковым при достаточном количестве времени брожения.

Существует три типичных температурных режима, в которых себя хорошо чувствуют соответствующие штаммы бактерий:

· Психрофильные штаммы при температуре ниже 25°С,

· Мезофильные штаммы при температуре 25-45°С,

· Термофильные штаммы при температуре свыше 45°С.

Большинство установок работают в мезофильном режиме.

Из-за большого избытка тепла от генератора для таких установок наблюдается тенденция высоких температур ферментатора. На практике в Германии большинство биогазовых установок <http://www.rosbiogas.ru/individualnye-biogazovye-ustanovki.html> работают при температурах 38-42°С (Рис.4). Психрофильный режим работы из-за длительного времени брожения и небольшой производимости газа в наших широтах больше не играет столь важной роли, в то время как установки с термофильным режимом работы пользуются все большим спросом, не в последнюю очередь через все большие размеры установок они оснащаются устройствами автоматизированного управления.

Влияние температуры ферментатора на активность бактерий (рис.4). Чем выше температура, тем чувствительнее бактерии к ее колебаниям, в первую очередь, если они краткосрочные. Это четко видно из относительно узкого максимума кривой и ее стремительного падения при термофильном режиме. В то время как в мезофильном режиме ежедневные колебания в 2-4°С едва ли имеют влияние на бактерии, то в термофильном режиме такие колебания должны быть не более 1°С. Одноразовое размещение плохо уплотненного материала (с большим количеством кислорода) или большое количество очень холодного материала, а также остановка работы мешалки на несколько часов (в первую очередь в зимнее время), может вызвать такое изменение температуры на 1°С.



Рис.4: Влияние температуры на активность бактерий [3].

Примечание: Показано средняя кислотность при окислении бактериями глюкозы в зависимости от температуры.

Интересен тот факт, что в природе существуют экстремально термофильные формы, развивающиеся в зонах горячих источников. Это, например, Methanothermus fervidus, растущий при температурах 65-95ºС. Появились публикации об обнаружении бактерий, способных расти при температуре 250-300 ºС и давлении 265 атм. (при этом давлении вода в жидком состоянии может находиться до 460ºС). Эти бактерии выделены из проб воды, поднятых с глубины 2560 м над поверхностью Тихого океана, где предположительно они существуют в горячих струях, выбрасываемых на дне океана так называемыми «черными гейзерами». Давление в районе обнаружения бактерий около 250 атм., а температура воды может быть выше 350º C.В связи с этим исследователи начинают переоценивать границы условий, при которых способны развиваться прокариоты.

Образование метана происходит в осадках морей и пресноводных водоемов, болотах, почвах тундры и рисовых полей. Метанобразующие археи входят в состав кишечной микрофлоры, в частности они, развиваются в отделе желудка - рубце жвачных животных. Накопление метана, хотя и незначительное, отмечено и в кишечнике человека. Метанобразующие бактерии интенсивно синтезируют витамин В12 и обеспечивают им своих хозяев. Метанобразующие бактерии являются внутриклеточными симбионтами некоторых простейших, особенно развивающихся при отсутствии молекулярного кислорода [4].

### 4.2 Экологическое значение

Важная особенность метаногенов - способность активно развиваться в анаэробных условиях в тесном симбиозе с другими группами бактерий, создающими для них благоприятные условия и обеспечивающих необходимыми субстратами для роста и синтеза метана.

Так как метаногены используют ограниченный набор субстратов, их распространение в природе тесно связано с развитием образующих эти субстраты микроорганизмов. Совместно с последними метанобразующие бактерии обеспечивают протекание в природе важного крупномасштабного процесса - анаэробного разложения органических соединений, в первую очередь целлюлозы. Выделяют три основные стадии анаэробного разложения органического вещества. Первая - определяется деятельностью организмов с активными гидролитическими ферментами. Они разлагают сложные органические соединения на более простые. Вторая стадия связана с активностью водородообразующих бродильщиков, конечными продуктами которых являются H2,CO2,CO,низшие жирные кислоты (в первую очередь ацетат) и спирты. Завершают анаэробную деструкцию органического вещества метанобразующие бактерии. Поскольку главным экологическим фактором, определяющим развитие метаногенов, является выделение H2,в природе созданы и существуют ассоциации между водородовыделяющими и метановыми бактериями. Примером такой естественной системы могут служить бактериальные ассоциации, обитающие в рубце жвачных животных и обеспечивающие разложение целлюлозы, пектина и других органических субстратов. О масштабности процессов, связанных с деятельностью метановых бактерий, свидетельствует тот факт, что более 20% мировых запасов CH4 имеют биогенное происхождение [1].

## 5. Промышленное значение

Неоценима практическая польза термофильных метановых бактерий в современной жизни. Видная роль в изучении термофильных микроорганизмов принадлежит А. А. Имшенецкому, Е. Н. Мишустину, Б. Л. Исаченко и др. Эти ученые не ограничились разработкой только теоретической стороны проблемы явления термофилии, и их исследования имели важное практическое значение.

Одна из главных отличительных особенностей термофилов - ускоренный обмен веществ. За последние годы благодаря новейшим методам исследования удалось накопить данные, частично раскрывающие механизмы, при помощи которых клетка защищается от воздействия высокой температуры. Установлено, что наиболее существенные изменения под воздействием высокой температуры претерпевают клеточные белки и липиды, с которыми связаны основные жизненные процессы.

Благодаря высокой скорости роста термофильные микроорганизмы могут найти широкое применение в самых различных отраслях промышленности и сельского хозяйства.

Так, существуют методы утилизации органических отходов в так называемых метантенках. В метантенках при высокой температуре и отсутствии молекулярного кислорода происходит сбраживание органических веществ разнообразной микрофлорой, в результате чего образуются водород и углекислота, которые и используются археями при образовании метана. В среднем на поддержание требуемой температуры ферментации расходуется от 15 - 20 % (мезофильный процесс) до 30 - 50 % (термофильный процесс) биогаза. Поэтому одним из важных моментов эксплуатации метантенков является их хорошая теплоизоляция. Благодаря высокой температуре процессы идут с высокой интенсивностью. В литературе сообщалось, что от трупа лошади, помещенного в такой метантенк, через неделю остался один скелет. Были сконструированы также установки для получения горючего газа - метана из соломы, что, как предполагают, может обеспечить газом небольшие сельскохозяйственные поселения.

Получение метана - важный путь утилизации сельскохозяйственных отходов. Он получается в виде биогаза - смеси метана и углекислого газа. Поскольку биогаз практически получают из сложных органических веществ (целлюлозы, крахмала, белков, липидов, нуклеиновых кислот), то для метанообразования применяют многокомпонентные микробные ассоциации.

Процесс метанобразования отличается высокой эффективностью: до 90 - 95% используемого углерода переходит в метан. Поэтому метаногенные ассоциации с успехом применяют для очистки сточных вод от органических загрязнений с одновременным получением высококалорийного топлива. Использование биомассы в качестве источника топлива открывает определенные перспективы решения проблемы энергетики и охраны окружающей среды [1].

Также термофильные бактерии издавна применяются для очистки сточных вод. Интерес к метановому брожению резко возрос, когда была обнаружена способность бактерий продуцировать витамин В12. В. Н. Букин показал возможность получения этого ценного витамина при сбраживании термофильными метановыми бактериями ацетоно-бутиловой барды. Одновременно может быть собран выделяющийся при этом метан (10- 20 м3 на 1 м3 сброженной жидкости) [3].

## 6. Методы исследований

Для преимущественного развития, роста, выделения и очистки метаногенов используют среду следующего состава (г/л):KH2PO4 - 0,38; Na2HPO4 - 0,53; NH4Cl - 0,30; NaCl - 0,30; CaCl2\*2H2O - 0,11; MgCl2\*6H2O - 0,10;резазурин - 0,001(индикатор восстановительных условий), раствор микроэлементов - 1,0 мл/л; раствор витаминов - 0,5 мл/л.

Конечная концентрация микроэлементов в среде должна составить (мг/л): FeCl2\*4H2O - 0,944; H3BO3 - 0,062; CuCl2 - 0,013; MnCl2\*4H2O - 0,061; CoCl2\*6H2O - 0,066; NiOH - 0,400; ZnCl2 - 0,068; Na2SeO3 - 0,017; NaWO4 - 0,029; Na2MoO4 - 0,021.

Конечная концентрация витаминов в среде должна составлять (мг/л): биотин - 0,01; фолиевая кислота - 0,01;никотинамид-0,10; n-амиобензойная кислота-0,05;тиамин- 0,10;пантотеновая кислота - 0,05, пиридоксамин - 0,25; цианкобаламин - 0,05;рибофлавин - 0,05.

Минеральную среду кипятят для избавления от кислорода, затем охлаждают до комнатной температуры и разливают под током азота (свободного от кислорода) для предотвращения диффузии кислорода в среду. Среды разливают во флаконы, закрывают резиновыми пробками и зажимают алюминиевыми колпачками. Затем газовую фазу заменяют на требуемую. Конечное давление во флаконах составляет - 1,6 атм. Среды стерилизуют автоклавированием, а раствор витаминов - фильтрованием. После стерилизации в среду добавляют раствор Na2S до конечной концентрации 278мг/л, витамины, а также требуемое количество стерильного субстрата.

Все пересевы микроорганизмов осуществляют с помощью стерильных шприцев, не нарушая условий анаэробиоза.

Для выделения и количественного учета метанобразующих бактерий в агаризованных средах наибольшее распространение получили посевы во вращающихся пробирках. Полностью подготовленные пробирки со средой стерилизуют, и расплавленный агар помещают в водяную баню. В такой агар производят посев разведений почвенной суспензии. Пробирки вращают вручную или в специальном вращающемся зажиме. Пробирку с застывшим агаром снимают и сохраняют в вертикальном положении, так как скапливающийся конденсат может смыть посев.

Выделение чистых культур метаногенов производят методом рассева активных накопительных культур на агаризованные среды в чашках Петри в анаэробном боксе. Чистые культуры могут быть также получены при выделении отдельных колоний, вырастающих во вращающихся пробирках по Хангейту. Выделение также следует проводить в анаэробном боксе. Проверку чистоты культур метанобразующих бактерий следует проводить очень тщательно. Микроскопирование культур на разных стадиях роста дает ценное указание на однородность культуры. Проверку также проводят путем рассева на твердые среды в анаэробных условиях. Материал берут из отдельных колоний с помощью микробиологической петли и осуществляют поверхностный посев на среду в чашках Петри. При глубинном посеве из расплавленной агаризованной среды стерильным шприцем вносят сусло клеток из отдельной колонии, приготовленную в стерильном анаэробном растворе. Свидетельством чистоты культуры является однородность колоний и совпадение их признаков с описанными ранее. Помимо обычных сред для банальной микрофлоры необходимо проверять культуры на присутствие сульфатредуцирующих бактерий - частых спутников метанобразующих бактерий. Кроме того, возможно присутствие анаэробов со своеобразным обменом, участвующих в синтрофных ассоциациях с метанобразующими бактериями. Особенно жесткие требования к чистоте культуры предъявляются в том случае, когда исследуют использование метанобразующими бактериями иного субстрата, чем водород- углекислотная смесь [2].

## Заключение

Вхождение метаногенов в состав археобактерий указывает на их древнейшее происхождение. Данные о составе атмосферы первобытной земли позволяют предположить, что метаногены могли возникнуть около 3-3,5 млрд. лет назад. Предшественники их могли быть первично анаэробные бродильщики, поскольку метаногены обладают более организованным механизмом получения энергии по сравнению с брожением. На последующее уменьшение в биосфере необходимого для них источника энергии - молекулярного водорода - привело к тому, что метаногены оказались эволюционно тупиковой ветвью.

## Список литературы

1. Герхард Ф. Методы общей бактериологии. М.: Мир.1986. С.470.

. Нетрусов А.И. Практикум по микробиологии. М : Academia, 2005.С. 216-219.

. Логинова Л. Г., Н.И.Позмогова. Введение. Бактерии и аскомицеты. М.: Просвещение, 1974.С.403-412.

. Гусев М.В., Минеева Л.А. Микробиология. М.: Академия, 2008.С.423-426.

. Определитель бактерий Берджи. М.: Мир, 1980.Т.2 С.262-263.