

БІОКАТАЛІТИЧНЕ ЗНИЖЕННЯ ТОКСИЧНИХ КОНЦЕНТРАЦІЙ ГАЗІВ (CH_4 , CO , CO_2 , NH_3) В ПОВІТРІ ЗАМКНУТИХ СИСТЕМ ЖИТТЄЗАБЕЗПЕЧЕННЯ

*Клітини *Methylobacterium rubra* ІМВ-15Ш як біокатализатори, вирощені на метані як вуглецева сировина й іммобілізовані на носії, протягом тривалої безупинної роботи зберігають каталітичну активність і здатні знижувати в замкнутій системі життєзабезпечення токсичні для життєдіяльності людини концентрації CH_4 , CO_2 , CO , NH_3 до концентрацій, встановлених санітарно-гігієнічними нормами.*

В умовах замкнутих систем життєзабезпечення (космічні кораблі, підводні човни та ін.) у процесі життєдіяльності однієї людини за добу може накопичуватися більше як 575 л CO_2 , 240 см³ CH_4 , 10 см³ CO , 240 см³ H_2 , NH_3 , оцтової кислоти. У цих умовах нормальна життєдіяльність людини пов'язана з великими нервово-емоційними й фізичними навантаженнями, і можлива, якщо концентрації вищевказаних газів не перевищують 40–60 мільйонних часток на об'єм газового середовища, що відповідає 0,004–0,006 % і допускається санітарно-гігієнічними нормами [1].

Відомо, що очищення повітря від CO_2 , H_2S , CO , CH_4 здійснюється або шляхом сорбції зазначених газів рідким сорбентом (ароматичні вуглеводні), або за допомогою різних каталізаторів при температурі 180–270 °C. У наш час CO і CO_2 видаляють із замкнутої системи життєзабезпечення шляхом перетворення їх на метан при високій температурі, а метан видаляють із повітряної суміші на хромово-мідних каталізаторах при високих температурах (400 °C) і тисках [2–4]. Відомо також можливість утилізації вуглекислоти за участю водневих бактерій у регенеративній ланці системи життєзабезпечення [5].

До недоліків вищенаведених методів можна віднести:

- 1) великі енергетичні витрати на видалення токсичних концентрацій газів з повітря;
- 2) багатостадійність цих процесів у хімічних реакторах;
- 3) необхідність підвищеної металомісткості хімічних реакторів, використовуваних у цих процесах, що зв'язано із застосуванням високого тиску;
- 4) висока собівартість каталізатора;

5) використання водневих бактерій не дозволяє видаляти з повітря CH_4 і CO ;

6) усі вищезазначені способи не передбачають одночасного видалення CH_4 , CO , CO_2 , NH_3 .

Метою роботи є спрощення очищення повітря в замкнутих системах життєзабезпечення, а саме усунення необхідності використання хімічних каталізаторів, металомістких реакторів, високих температур, тисків, а також зниження витрат енергії, підвищення ефективності видалення газів із замкнутих систем життєзабезпечення. Поставлена мета досягається за рахунок застосування біокатализаторів у вигляді іммобілізованих на носії клітин метанотрофних бактерій, *Methylobacterium rubra* ІМВ-15Ш, що здатні асимілювати CH_4 , CO , CO_2 , NH_3 в м'яких умовах (при $t = 30$ °C і атмосферному тиску). Штам *Methylobacterium rubra* ІМВ-15Ш зберігається в колекції метанотрофних культур у ІМВ НАН України (м. Київ), а також депонований у колекції НДІ генетики й селекції промислових мікроорганізмів (м. Москва) і описаний у роботі [6].

Процес видалення CH_4 , CO , CO_2 , NH_3 із замкнутих систем апробовано у модельних експериментах в Інституті мікробіології і вірусології ім. акад. Д. К. Заболотного НАН України.

Клітини метанотрофних бактерій *Methylobacterium rubra* ІМВ-15Ш вирощували в конічних колбах об'ємом 0,75 л на кругових качалках (180 об./хв). Колби заповнювали газами у співвідношенні $\text{CH}_4 : \text{O}_2 : \text{N}_2 = 4 : 3 : 3$. Робочий об'єм колб – 200 мл. Нарощування клітин метанотрофів здійснювали протягом двох діб на мінеральному середовищі такого складу (г/л):

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,5;

KH_2PO_4 – 0,4;

$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ – 0,4;

NaCl – 0,3;
MgSO₄ · 7H₂O – 0,3;
CaCl₂ · 2H₂O – 0,02;
FeCl₃ · 6H₂O – 0,001,
при $t = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$, pH = 6, 5–7, 5.

Для кращого закріплення клітин метанотрофних мікроорганізмів у зоні реактора проводили їх іммобілізацію в такий спосіб: концентровану суспензію клітин у кількості 5 мл наносили на 3 г носія. Як носій використовували породу вугільних шахт. Породу попередньо подрібнювали до розмірів гранул 3 мм, промивали проточною водою протягом 24 годин і стерилізували при 1,5 атм, pH на поверхні носія 7,0. Іммобілізовані на носії клітини поміщали в скляну колонку розміром 70 × 40 мм і підключали до стендової установки з об'ємом газової фази $V = 100$ мл (рис. 1), на якій моделювали умови замкнутої системи життєзабезпечення людини, тобто створювали у повітрі концентрацію газів CH₄, CO, CO₂, NH₃ = 0,03 %.

Видалення газів із повітря здійснювалося при прокачуванні газоповітряної суміші зі швидкістю від 0,002 до 1,14 л/год через скляну колонку з клітинами, іммобілізованими на носії, за допомогою перистальтичної помпи. Газоповітряна суміш циркулювала по відповідних магістралях. Газова фаза становила в резервуарі $V = 100$ мл

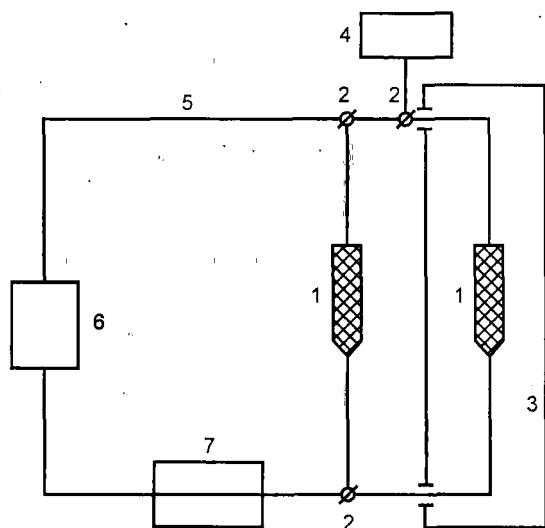


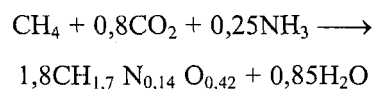
Рис. 1. Схема установки для моделювання зниження токсичних концентрацій газів біокатализаторами з повітря замкнутих систем життєзабезпечення:

1 – реактор із клітинами, іммобілізованими на носії, біокатализатор; 2 – триходовий кран; 3 – холодильна камера; 4 – резервуар для періодичної подачі мінерального середовища до клітин; 5 – магістралі для подачі газоповітряної суміші; 6 – резервуар для створення і збереження досліджуваних концентрацій газів і штучно створених газоповітряних сумішей; 7 – перистальтична помпа

(рис. 1). Концентрацію клітин в дослідях визначали за оптичною щільністю суспензії на ФЕК-56М; pH на поверхні носія визначали за допомогою хімічних індикаторних фарб. Біокаталітичну активність вільних клітин визначали полярографічним методом за допомогою датчика рО₂ (катод – платина, анод – Ag закритий мембраною з фторопласту, товщиною 5–7 мкм; робоча напруга – 0,5 В). Споживання кисню вимірювали в термостатних умовах при $t = +30\text{ }^{\circ}\text{C}$, в герметичній комірці з оргскла з отвором для введення бактеріальної суспензії й досліджуваного субстрату. Об'єм комірки – 2,7 мл. Споживання метану визначали на хроматографі «Цвет» – 4–65 с полум'яно-іонізаційним детектором. Споживання CO і CO₂ визначали на хроматографі ЛХМ–8МД, детектор – катарометр.

Раніше встановлено [6], що більш високі концентрації метану активно споживаються досліджуваною клітинною популяцією. На рис. 2 показано споживання низьких концентрацій метану іммобілізованими (1) і вільними (2) клітинами *Methylobacter rubra* IMB-15Ш (20 мг АСВ). У результаті проведених експериментів встановлено, що метанотрофні бактерії здатні видаляти з газової фази випробовувані концентрації метану в умовах, що моделюють систему життєзабезпечення, до концентрацій, які нижчі за встановлені медичними нормами (заштрихована область, рис. 2). Швидкість видалення випробовуваних концентрацій метану клітинами, іммобілізованими на носії, вища, ніж у вільних клітин, у 2,8 раза (рис. 2).

Метою наступного експерименту було показати здатність *Methylobacter rubra* IMB-15Ш фіксувати CO₂ й окиснювати CO. Умови й постановка дослідів аналогічні до описаних раніше. При вивченні здатності фіксувати CO₂ клітинами *Methylobacter rubra* IMB-15Ш враховували, що при трансформації CH₄ в біомасу є надлишок протонів і електронів, які повинні акцептуватися іншими субстратами при окисно-відновних реакціях метаболізму метану [6]. Теоретичний розрахунок утворення біомаси з CH₄:



показує, що при асиміляції 1 М CH₄ може акцептуватися 0,8 М CO₂ [7]. Експериментальні дані, як і теоретичні розрахунки, показали, що досліджувана клітинна популяція активно фіксує CO₂.

На рис. 3 показано окиснення CO клітинами метанотрофних бактерій. У результаті проведе-

них експериментів встановлено, що метанотрофні клітини, іммобілізовані на носії, здатні окисляти СО при наявності метану в атмосфері повітря, що зумовлено неспецифічністю метангідроксилази. Трансформація СО метанотрофними клітинами можлива також при наявності NH_2OH , який є продуктом трансформації NH_3 .

Відомо, що в результаті життєдіяльності людини в замкнутій системі життєзабезпечення накопичується аміак (NH_3). В одному об'ємі води при температурі 20°C розчиняється близько 70 об'ємів аміаку. При прокачуванні повітря, що містить аміак, через реактор із біокаталізатором аміак розчиняється у водному середовищі й абсорбується. При цьому *Methylobacterium rubra* ІМВ-15Ш може асимілювати NH_3 , що надходить у живильне середовище з повітря. Умови й постановка дослідів аналогічні до описаних у першому експерименті. Концентрацію аміаку визначали за кількістю амонійного азоту [8]. На рис. 4 показано споживання NH_3 клітинами метанотрофних бактерій. Зниження вмісту NH_3 й приріст біомаси свідчать про те, що метанокислючі бактерії асимілюють аміак як джерело азотного харчування. Унаслідок неспецифічності метангідроксилази досліджувана клітинна популяція може окиснювати аміак, і цей процес поєднаний із синтезом АТФ і НАД (тобто з одержанням енергії). K_m для NH_3 дорівнює $2,4 \times 10^{-3}$ [6]. Це свідчить про те, що при досліджуваному, а також при нижчому вмісті аміаку в повітрі замкнутої системи життєзабезпечення аміак буде або асимілюватися клітинами як джерело азотного харчування, або окиснюватися метангідроксилазою.

Оскільки в замкнутій системі життєзабезпечення можуть накопичуватися різні концентрації газів, досліджували, як впливає швидкість циркуляції газоповітряної суміші через іммобілізовані клітини на інтенсивність процесу окиснення CH_4 (рис. 5). Представлені на рис. 5 результати показують активність споживання CH_4 іммобілізованими клітинами (20 мг АСВ) при різній швидкості циркуляції газоповітряної суміші. Встановлено, що в умовах, які моделюють замкнуту систему життєзабезпечення, зі збільшенням швидкості циркуляції газоповітряної суміші через досліджувану систему збільшується швидкість видалення метану з повітря, а отже, збільшується швидкість видалення й інших газів із замкнутої системи.

Ефективність використання клітин, іммобілізованих на носіях, залежить від стабільності їх каталітичної активності. При розрахунку даного параметра враховували інактивацію біокаталіза-

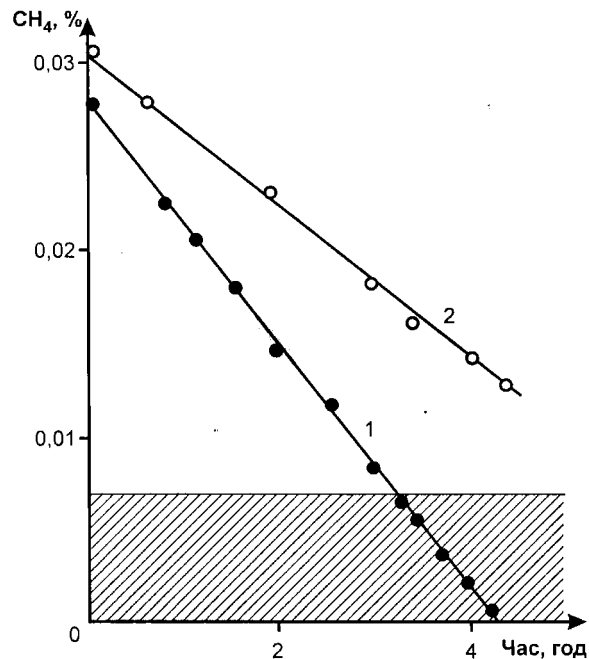


Рис. 2. Зниження концентрації метану клітинами метанотрофних мікроорганізмів, іммобілізованими на носії (1), і вільними клітинами в розчині (2)

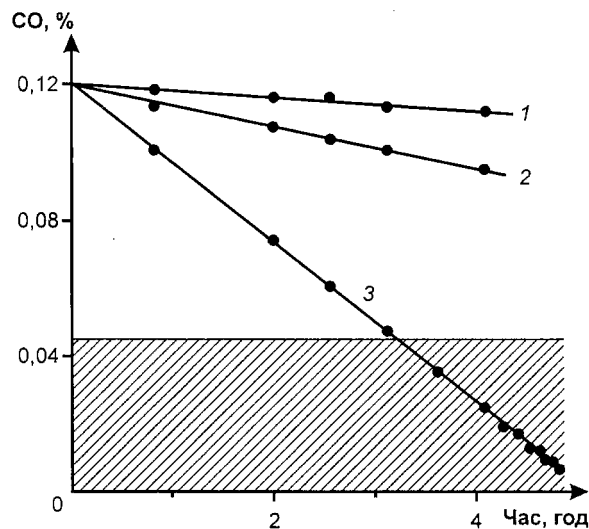


Рис. 3. Утилізація СО метанотрофними клітинами в різних умовах:
1 – СО; 2 – СО + NH_2OH ; 3 – СО + CH_4

тора в ході експлуатації. Результати, представлені на рис. 6, показують інактивацію біокаталізатора залежно від часу його експлуатації й умов збереження.

Характер кривих протікання інактивації метанотрофних клітин, іммобілізованих на носії, можна описати математичним рівнянням:

$$A_t = A_0 e^{-kt}, \quad (1)$$

де: A_0 – вихідна активність метанотрофних клітин, іммобілізованих на носії; A_t – активність

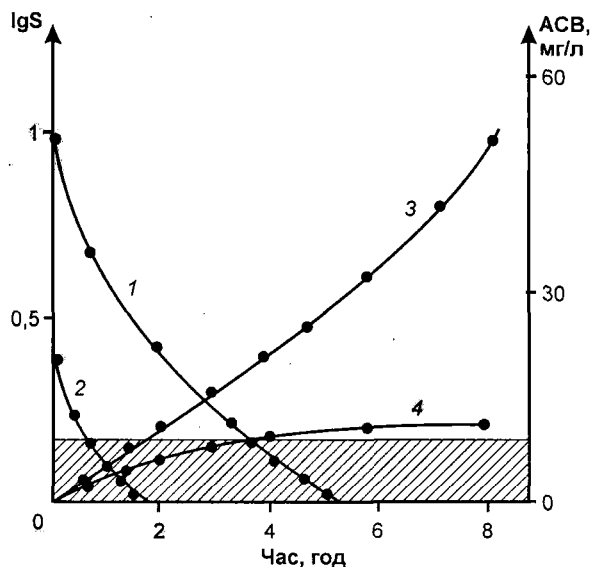


Рис. 4. Споживання NH_3 і накопичення біомаси клітинами метанотрофних бактерій: 1, 2 – споживання 10 і 4 мг NH_3 ; 3, 4 – приріст біомаси; S – концентрація NH_3

метанотрофних клітин, іммобілізованих на носії, у процесі їх експлуатації; K – коефіцієнт інактивації, $K = \ln(A_0/A_t) / t$; t – час.

Відповідно до рівняння (1) загальна кількість споживаного метану з дослідної системи, що моделює умови замкнутої системи життєзабезпечення, може бути виражена інтегралом:

$$P_t = A_0 \int_0^t e^{-kt} dt = (A_0/K)(1 - A_t/A_0), \quad (2)$$

де: P_t – кількість метану, споживаного клітинами, іммобілізованими на носії.

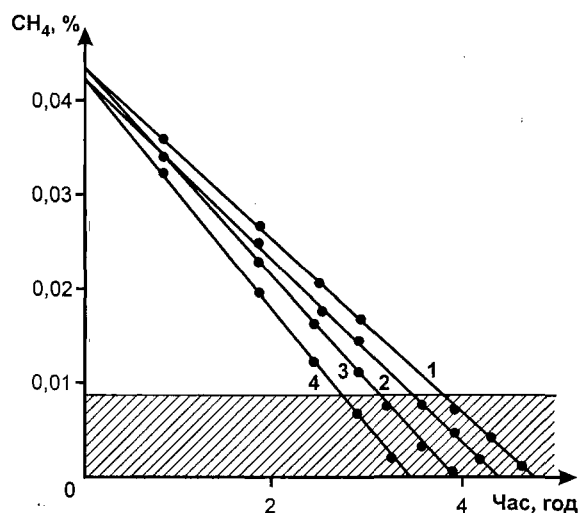


Рис. 5. Утилізація метану іммобілізованими клітинами (20 мг АСВ) при різній швидкості циркуляції газоповітряної суміші (л/год): 1 – 0,02; 2 – 0,3; 3 – 0,66; 4 – 1,14

Для зручності оцінки можливості роботи біокатализатора в часі ми ввели поняття ступінь використання біокатализатора (R_A), який визначали за формулою:

$$R_A = 1 - A_t/A_0. \quad (3)$$

Мінімальну середню швидкість видалення метану ($\bar{A}_t$) із системи обчислювали за рівнянням:

$$\bar{A}_t = A_0 (1 - e^{-kt}) / ktm_t, \quad (4)$$

де: m_t – біомаса біокатализатора, мг.

Функцію інтенсивності процесу (I_t) визначали як добуток загальної кількості метану і швидкості його видалення.

$$I_t = P_t \cdot \bar{A}_t, \quad (5)$$

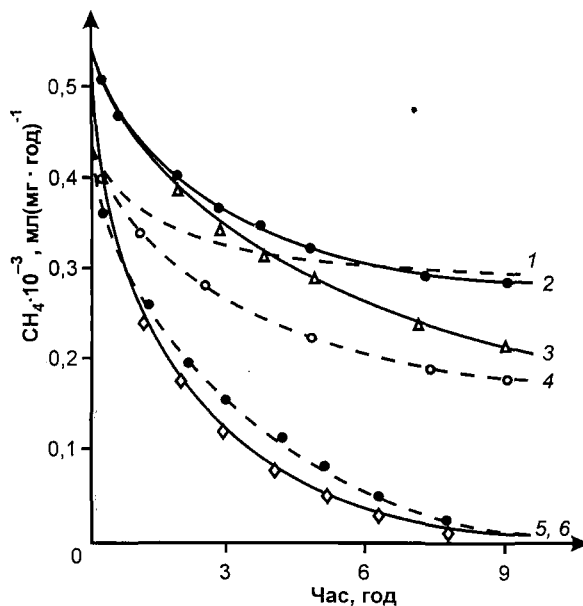


Рис. 6. Інактивація біокатализатора залежно від часу експлуатації та умов збереження: 1, 4, 6 – в присутності повітря, CO , CO_2 , H_2CH_4 , NH_3 ; 2, 3, 5 – в присутності повітря і CH_4 при чергуванні роботи біокатализатора (10 годин) і збереженні в холодильнику (14 годин); 1, 3 – в атмосфері H_2 ; 2, 4 – збереження в умовах експлуатації біокатализатора; 5, 6 – збереження при температурі та атмосфері експлуатації біокатализатора

Розрахунки за вищенаведеними формулами представлено на рис. 7, 8. Результати, подані на рис. 7, показують залежності, що характеризують безперервне використання біокатализатора в умовах замкнутої системи життєзабезпечення. Як бачимо, максимальна інтенсивність процесу досягається при ступені використання біокатализатора $R_A = 0,66$. Однак величина інактивації біокатализатора до цього моменту починає різко збільшуватися (рис. 6). Тому доцільно викори-

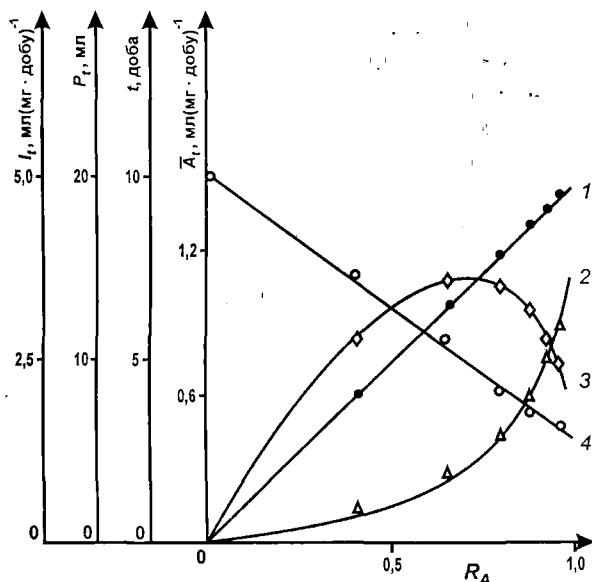


Рис. 7. Графічне зображення показників, які характеризують параметри роботи біокатализатора в умовах безупинної роботи в замкнутих системах життєзабезпечення:

1 – кількість спожитого метану до даного моменту часу (P_t); 2 – час, необхідний для досягнення визначеного ступеня використання біокатализатора (t); 3 – функція інтенсивності процесу (I_t); 4 – мінімальна середня швидкість споживання метану ($\bar{A}_t$)

стовувати біокатализатор до досягнення його максимальної активності. З огляду на те, що швидкість споживання метану клітинами, іммобілізованими на носії, вища, ніж у вільних клітин (рис. 2), ефективність використання іммобілізованих клітин у системі життєзабезпечення буде в 2,8 раза вища, а загальна кількість спожитого метану при цьому становитиме 10 мл/мг АСВ (рис. 7). Отже, щоб видалити 300 мл CH_4 з повітря замкнутої системи об'ємом 1 м^3 , необхідно 30 мг АСВ клітин, іммобілізованих на носії, при їх безупинній 34-годинній роботі. Враховуючи техніко-біологічні характеристики системи очистки повітря, для збільшення надійності роботи біокатализатора з іммобілізованими клітинами й помпи, що здійснює циркуляцію газоповітряної суміші через каталізатор, бажано скоротити час безупинної роботи біореактора до 10 годин.

При використанні біокатализатора в умовах, що моделюють замкнуту систему життєзабезпечення, кожену добу протягом 10 годин і при наступному збереженні біокатализатора в проміжках між його використанням у холодильній камері при $+5^\circ\text{C}$ максимальна інтенсивність процесу видалення метану (а значить і його аналогів) триває до 10 діб при ступені використання біо-

катализатора до $R_A = 0,6$ (рис. 8). При цьому для зниження токсичних концентрацій CH_4 і його аналогів, що безупинно надходять (щодо 300 мл) у замкнуту систему життєзабезпечення об'ємом 1 м^3 , до встановлених санітарно-гігієнічних норм їх концентрацій у повітрі необхідна наявність іммобілізованих клітин у біореакторі 139,2 мг АСВ.

Результати, наведені на рис. 8, показують залежності, що характеризують періодичне використання біокатализатора (при збереженні його щодоби протягом 10 годин при $t = +5^\circ\text{C}$).

У результаті проведених експериментів установлено, що пропонувані біокатализатор (клітини *Methylomonas rubra* ІМВ-15Ш, вирощені на метані як вуглецева сировина й іммобілізовані на носії) протягом тривалої (6 місяців) безупинної роботи зберігає каталітичну активність і знижує в замкнутій системі життєзабезпечення токсичні для життєдіяльності людини концентрації CH_4 , CO_2 , CO , NH_3 до концентрацій, встановлених санітарно-гігієнічними нормами. Необхідна швидкість видалення цих газів із повітря регулюється швидкістю циркуляції їх за допомогою помпи через біокатализатор. Видалення CH_4 , CO , NH_3

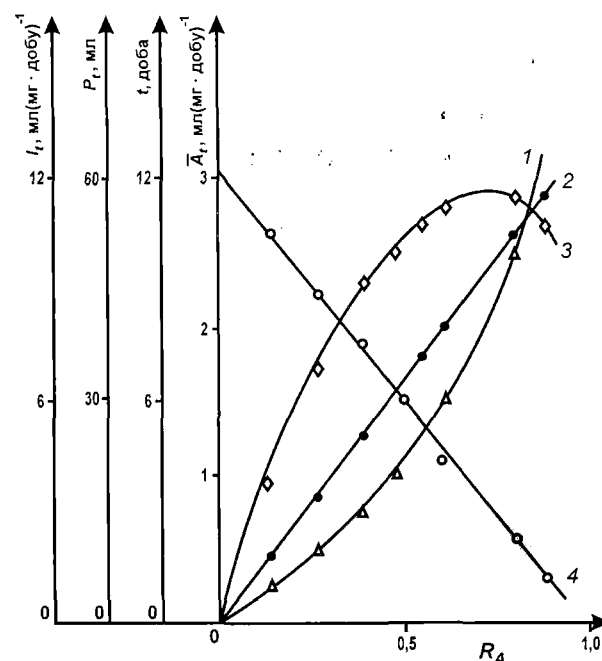


Рис. 8. Графічне зображення показників, які характеризують параметри роботи біокатализатора в умовах безупинної роботи в замкнутих системах життєзабезпечення протягом 10 год/добу:

1 – кількість спожитого метану до даного моменту часу (P_t); 2 – час, необхідний для досягнення визначеного ступеня використання біокатализатора (t); 3 – функція інтенсивності процесу (I_t); 4 – мінімальна середня швидкість споживання метану ($\bar{A}_t$)

відбувається за рахунок його окиснення метангидроксилазою, видалення CO_2 – унаслідок здатності використовуваних бактерій гетеротрофно фіксувати CO_2 .

Таким чином, використання пропонованого способу очищення повітря від токсичних концентрацій газів має такі переваги перед існуючими хімічними:

1) використовуються біокатализатори (мікроорганізми), отримані з дешевої сировини (метан);

2) очищення відбувається при фізіологічних температурах і тиску ($t = 28\text{--}36^\circ\text{C}$, $P = 760$ мм рт. ст.);

3) знижуються витрати на підтримку високих

температур і створення високого тиску, спрощується використання устаткування;

4) використання як біокатализатора метанотрофних мікроорганізмів дозволяє одночасно видалити із замкнутої системи життєзабезпечення CH_4 , CO , CO_2 , NH_3 ;

5) зручність, надійність, простота, легкість, (вага біокаталітичної системи не більш як 100 г).

6) іммобілізація клітин метанотрофних бактерій на носіях забезпечує безперервність роботи біокаталітичного реактора протягом 6 місяців;

7) іммобілізація клітин запобігає виносу їх із біореактора й може використовуватися для поліпшення екологічних умов існування людей у замкнутих системах життєзабезпечення.

1. Яздовский В. И. Искусственная биосфера.- М.: Наука, 1976.
2. Авторское свидетельство № 577944. Бюл. № 39, опубл. 25.10.77
3. Авторское свидетельство № 458251. Бюл. № 6, опубл. 05.07.77.
4. Авторское свидетельство № 295448. Бюл. № 13, опубл. 05.04.77.
5. Волова Т. Г., Окладников Ю. Н., Сидько Ф. Е., Тресков И. А., Трубочев И. В., Федорова Н. Э. Производство

белка на водоросле,- Новосибирск: Наука, Сибирское отделение, 1981.

Малашенко Ю. Р., Романовская В. А., Троценко Ю. А. Метаноокисляющие микроорганизмы.-М.: Наука, 1976.
Мелашенко Ю. Р., Романовская В. А., Соколов И. Г., Крыштаб Т. П., Людвиченко Е. С. //Украинский биохимический журнал- Т. 52.- № 2.- 159.- 1980.
Бославская С. С, Трубецкова О. М. Практикум по физиологии растений,- МГУ, 1964.

V. Karpenko

THE BIOCATALYTIC REDUCTION OF THE TOXIC CONCENTRATIONS OF GASES IN THE AIR OF THE CLOSED LIFE-SUPPORT SYSTEMS

*Cells of *Methylobacterium rubra* IMB-15III as biocatalysts grown on methane as carbon source and immobilized on carrier during long unceasing work keep catalytic activity and can reduce toxic for human vital activity concentrations of CH_4 , CO_2 , CO , NH_3 in closed life-support system to sanitary-hygienic rates.*