

**МИКРОБИОЛОГИЯ ИНСТИТУТИ ҲУЗУРИДАГИ ИЛМИЙ  
ДАРАЖАЛАР БЕРУВЧИ DSc.02/30.12.2019.В.38.01 РАҚАМЛИ  
ИЛМИЙ КЕНГАШ**

---

**МИКРОБИОЛОГИЯ ИНСТИТУТИ**

**ТАШБАЕВ ШЕРЗОДБЕК АБДУРАСУЛОВИЧ**

**ФАОЛ МЕТАН ҲОСИЛ ҚИЛУВЧИ МИКРООРГАНИЗМЛАР  
АССОЦИАЦИЯСИ АСОСИДА БИОГАЗ ОЛИШ**

**03.00.12 – Биотехнология**

**БИОЛОГИЯ ФАНЛАРИ БЎЙИЧА ФАЛСАФА ДОКТОРИ (PhD)  
ДИССЕРТАЦИЯСИ АВТОРЕФЕРАТИ**

**Тошкент-2020**

**Фалсафа доктори (PhD) диссертацияси автореферати мундарижаси**  
**Оглавление автореферата диссертации доктора философии (PhD)**  
**Contents of dissertation abstract of doctor of philosophy (PhD)**

**Ташбаев Шерзодбек Абдурасулович**

Фаол метан ҳосил қилувчи микроорганизмлар ассоциацияси асосида  
биогаз олиш..... 3

**Ташбаев Шерзодбек Абдурасулович**

Получение биогаза на основе активной метанообразующей ассоциации  
микроорганизмов..... 23

**Tashbaev Sherzodbek Abdurasulovich**

Obtaining biogas based on an active methano-forming association of  
microorganisms..... 41

**Эълон қилинган ишлар рўйхати**

Список опубликованных работ  
List of published works..... 44

**МИКРОБИОЛОГИЯ ИНСТИТУТИ ҲУЗУРИДАГИ ИЛМИЙ  
ДАРАЖАЛАР БЕРУВЧИ DSc.02/30.12.2019. В.38.01 РАҚАМЛИ  
ИЛМИЙ КЕНГАШ**

---

**МИКРОБИОЛОГИЯ ИНСТИТУТИ**

**ТАШБАЕВ ШЕРЗОДБЕК АБДУРАСУЛОВИЧ**

**ФАОЛ МЕТАН ҲОСИЛ ҚИЛУВЧИ МИКРООРГАНИЗМЛАР  
АССОЦИАЦИЯСИ АСОСИДА БИОГАЗ ОЛИШ**

**03.00.12 – Биотехнология**

**БИОЛОГИЯ ФАНЛАРИ БЎЙИЧА ФАЛСАФА ДОКТОРИ (PhD)  
ДИССЕРТАЦИЯСИ АВТОРЕФЕРАТИ**

**Тошкент-2020**

**Фалсафа доктори (PhD) диссертацияси мавзуси Ўзбекистон Республикаси Вазирлар Маҳкамаси хузуридаги Олий аттестация комиссиясида В2017.1.PhD/В42 рақам билан рўйхатга олинган**

Диссертация Микробиология институтида бажарилган.

Диссертация автореферати уч тилда (ўзбек, рус, инглиз (резюме) Илмий кенгаш веб-саҳифаси [microbio@academy.uz](mailto:microbio@academy.uz) ва «ZiyoNet» ахборот таълим тармоғида ([www.ziynet.uz](http://www.ziynet.uz)) жойлаштирилган.

<b>Илмий раҳбар:</b>	<b>Алимова Барно Хасановна</b> биология фанлари номзоди, катта илмий ходим
<b>Расмий оппонентлар:</b>	<b>Хўжамшукуров Нортожи Абдуҳалиқович</b> биология фанлари доктори, профессор
	<b>Расулов Бахтиёр Абдуғофурович</b> биология фанлари доктори
<b>Етакчи ташкилот:</b>	Самарқанд давлат университети

Диссертация ҳимояси Микробиология институти хузуридаги DSc.02/30.12.2019.В.38.01 рақамли Илмий кенгашининг 2020 йил «25» февраль куни соат 10<sup>00</sup> даги мажлисида бўлади. Манзил: 100128, Тошкент ш., Шайхонтоҳур тумани, А.Қодирий кўчаси 7<sup>6</sup>-уй, Микробиология институти мажлислар зали, 3-қават Тел.:(+99871) 241-92-28, факс:(+99871) 241-92-71; e-mail: [microbio@academy.uz](mailto:microbio@academy.uz).

Диссертация билан Микробиология институти Ахборот-ресурс марказида танишиш мумкин (№\_\_ рақами билан рўйхатга олинган). Манзил: 100128, Тошкент ш., Шайхонтоҳур тумани, А.Қодирий кўчаси 7<sup>6</sup>-уй, Микробиология институти маъмурий биноси, 5-қават. Библиотека. Тел.:(+99871) 241-92-28, (+99871) 241-71-98, факс:(+99871) 241-92-71.

Диссертация автореферати 2020 йил «\_\_\_\_\_» куни тарқатилди.  
(2020 йил «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ рақамли реестр баённомаси).

**Арипов Тахир Фатихович**  
Илмий даража берувчи Илмий кенгаш раиси  
б.ф.д., профессор, академик

**Жураева Роҳила Назаровна**  
Илмий даражалар берувчи Илмий кенгаш  
илмий котиби, б.ф.н., катта илмий ходим

**Гулямова Ташхан Гафуровна**  
Илмий даражалар берувчи Илмий кенгаш қошидаги  
Илмий семинар раиси, б.ф.д., профессор

## **КИРИШ (фалсафа доктори (PhD) диссертацияси аннотацияси)**

**Диссертация мавзусининг долзарблиги ва зарурати.** Дунё иқтисодиётини, хусусан қишлоқ хўжалигини, жадал ривожлантиришнинг асосий муаммоларидан бири бу энергияга бўлган талабни қондиришдир. Бу муаммони ижобий ҳал этиш қайта тикланувчи муқобил энергия манбаларини олиш билан боғлиқ бўлган технологияларни ривожлантиришга асосланган. Муқобил энергия манбаларини кенг миқёсда ишлаб чиқариш ва улардан фойдаланиш, атмосферадаги карбонат ангидрид газининг тўпланиш даражасини барқарорлаштиради ҳамда унинг ортиб кетиш хавфини олдини олади. Шу сабабли, дунёда оммалашиб бораётган қайта тикланувчи юқори самарадор энергия манбаларидан амалиётда кенг фойдаланиш илмий ва амалий аҳамиятга эга.

Жаҳон амалиётида ноанъанавий энергия манбаларини ишлаб чиқариш ва бой табиий потенциалдан самарали фойдаланиш борасида илмий ишлар олиб борилмоқда. Жумладан, қайта тикланувчи органик субстратларга чорвачилик ва паррандачилик фермалари чиқиндилари, ўсимликлар қолдиқлари, озиқ-овқат ва енгил саноат чиқиндилари, маиший чиқиндиларининг ресурслари асосида биогаз олиш учун бошланғич хом-ашё захирасидан фойдаланиш, ҳамда биогаз ҳосил қилувчи метаноген бирлашма (ассоциация) органик моддаларнинг парчалаш жараёнини амалга оширувчи анаэроб ва факультатив-анаэроб микроорганизмларининг турли гуруҳлари фаолиятини аниқлаш, барқарор фаолият кўрсатувчи балансланган метаноген микроорганизмлар ассоциацияларини олиш муҳим ҳисобланади. Шу сабабли, қишлоқ хўжалигида чиқиндисиз ишлаб чиқариш технологияларини яратиш, чорвачилик ва паррандачилик фермалари чиқиндиларини қайта ишлаш жараёнининг самарадорлигини ошириш учун янги биотехнологиялар ишлаб чиқиш муҳим илмий ва амалий аҳамиятга эга.

Республикамизда энергетика тармоғи асосан углеводород хом-ашёларидан ва қайта тикланувчи энергия манбаларидан фойдаланиш соҳасида чора-тадбирлар ишлаб чиқиш ва амалиётга жорий қилишга алоҳида эътибор қаратилмоқда, шунингдек қайта тикланувчи хом-ашёлардан (чиқиндилардан) оқилона фойдаланиш, биогаз ва органик ўғит (ОЎ) олишнинг самарадорлигини ошириш борасида муайян натижаларга эришилмоқда. Ўзбекистон Республикасини янада ривожлантириш бўйича Ҳаракатлар стратегиясида «...қайта тикланадиган энергия манбаларидан фойдаланишни кенгайтириш»<sup>1</sup> вазифалари белгилаб берилган. Мазкур вазифаларини амалга оширишда, жумладан чорвачилик ва паррандачилик фермалари гўнгларида балансланган фаол метаноген ассоциация асосида биогаз олиш ва ундан ҳосил бўлган ОЎ (шламм) таркибидаги патоген микроорганизмларни зарарсизлантириб фойдаланиш технологиялари ишлаб чиқиш муҳим аҳамият касб этади. Ўзбекистон Республикаси Президентининг

---

<sup>1</sup> Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2017 йил 7 февралдаги ПФ-4947-сонли «Ўзбекистон Республикасини янада ривожлантириш бўйича Ҳаракатлар стратегияси тўғрисида» Фармони.

2017 йил 7 февралдаги ПФ-4947-сон «Ўзбекистон Республикасини янада ривожлантириш бўйича Ҳаракатлар стратегияси тўғрисида»ги Фармони, Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2017 йил 26 майдаги ПҚ-3012-сон «2017-2021 йилларда қайта тикланувчи энергетикани янада ривожлантириш, иқтисодиёт тармоқлари ва ижтимоий соҳада энергия самарадорлигини ошириш чора-тадбирлари Дастури тўғрисида»ги қарори ҳамда мазкур фаолиятга тегишли бошқа меъерий-ҳуқуқий ҳужжатларда белгиланган вазифаларни амалга оширишга ушбу диссертация тадқиқоти муайян даражада хизмат қилади.

**Тадқиқотнинг республика фан ва технологиялари ривожланишининг устувор йўналишларига мослиги.** Мазкур тадқиқот республика фан ва технологиялар ривожланишининг V. «Қишлоқ хўжалиги, биотехнология, экология ва атроф-муҳит муҳофазаси» устувор йўналишига мувофиқ бажарилган.

**Муаммонинг ўрганилганлик даражаси.** Биогаз ишлаб чиқариш технологиялари борасида дунё илмий адабиётларида кўплаб маълумотлар тўпланган. Кўпгина тадқиқотчилар биомассаларни анаэроб парчалашда гидролизловчи, ацидоген метаногенларнинг аҳамияти (Burak Demirel, 2008), биогаз ишлаб чиқаришнинг ҳозирги ҳолати ва унинг истикболлари (P. Weiland ва бошқ., 2010), биогаз ишлаб чиқариш учун қорамол гўнгини анаэроб шароитларда бижғитиш (В.Н. Giploid ва бошқ., 2010), мезофил шароитларда қаттиқ органик чиқиндиларни анаэроб шароитларда юқори даражада парчалаш (Dong–Hoon Kim ва бошқ., 2011), чўчка гўнгидан анаэроб шароитларда рН ни нейтрал назорат қилиш орқали биогаз ҳосил бўлишида микроорганизмлар ассоциациясининг аҳамияти (Jun Zhou., ва бошқ., 2016 ), қорамол гўнгидан биогаз олишнинг самарадорлиги (Lili Dong., ва бошқ., 2019), микроорганизмлар ассоциацияси ёрдамида биогаз ишлаб чиқариш ва бойитиш (Basma Omar., ва бошқ., 2019), каби тадқиқотларни киритиш мумкин.

Республика олимлари томонидан қишлоқ хўжалиги чиқиндиларидан, саноат оқава сувларини тозалаш иншоотларини органик чиқиндиларидан Куканова С.И., Ташпулатов Ж.Ж. (2012-2014 йй.), Давранов Қ.Д. ( 2015 й.), ва чўл ҳудудида учрайдиган айрим галофит ўсимлик биомассаларидан биогаз олиш бўйича Алиқулов Б.С (2018 й.), уларни саноат миқёсида ишлаб чиқариш соҳаларига тадбиқ этишда самарали илмий-амалий тадқиқот ишлари олиб борилмоқда. Бироқ, юқорида келтирилган тадқиқот ишларида метаноген микроорганизмлар ассоциациясини олиш ва уларни чорвачилик ва паррандачилик фермалари чиқиндиларидан барқарор биогаз олишда қўллаш борасида илмий изланишлар олиб борилмаган.

Шу сабабли Республикамизда илмий асосланган чиқиндисиз технологиялар асосида экологияга зарар келтирмайдиган қайта тикланувчи энергия манбасини (биогаз) ишлаб чиқариш илмий-амалий аҳамият касб этади.

**Диссертация тадқиқотининг диссертация бажарилган олий таълим муассасасининг илмий-тадқиқот ишлари режалари билан боғлиқлиги.** Диссертация тадқиқоти Микробиология институти илмий - тадқиқот ишлари режасининг ФА-Ф3-Т130 «Альтернатив энергия манбаларини (биогаз ва биодизель) микробиологик ҳосил бўлишининг регуляцияланиш механизмларини ўрганиш» (2008-2011 йй.); ФА-А6-Т214 «Табиий қайта тикланувчи ресурслар асосида биоёқилги олиш технологиясини ишлаб чиқиш» (2012-2014 йй.); ФА-А6-Т113 «Метаноген ферментацияни қўллаб парранда гўнги асосида органик ўғит олиш» (2015-2017 йй.) мавзуларидаги фундаментал лойиҳалар доирасида бажарилган.

**Тадқиқотнинг мақсади** биогазли ферментация жараёнини амалга ошириш учун фаол мезофил (БМММА) ва термофил (БТММА) балансланган метаноген микроорганизмлар ассоциацияларини олиш, биогазли ферментацияни жадаллаштириш ва улар асосида чорвачилик, паррандачилик фермалари чиқиндиларини қайта ишлашни янги самарали биотехнологиясини ишлаб чиқишдан иборат.

**Тадқиқотнинг вазифалари** қуйидагилардан иборат:

табиий манбалардан мезофил ва термофил метаноген микроорганизмларнинг фаол ассоциацияларини ажратиб олиш ҳамда уларнинг тангланган субстратлардан биогаз ҳосил бўлишига таъсирини аниқлаш;

ажратиб олинган мезофил ва термофил метаноген микроорганизмлар ассоциацияларидан фойдаланиб қорамол ва товуқ гўнгида биогаз ҳосил бўлиши шароитларини оптималлаштириш;

қорамол ва товуқ гўнгини биогазли ферментация динамикасида асосий гуруҳ микроорганизмлар миқдорини ўзгариб боришини таҳлил қилиш;

метаноген микроорганизмлар ассоциациялари таркибидаги айрим метан ҳосил қилувчи бактерияларнинг таксономик ўрнини молекуляр-генетик усулда аниқлаш;

мезофил шароитда биогазли ферментациянинг чиқиндиси бўлган шламни патоген бактериялардан зарарсизлантириш усулини ишлаб чиқиш;

биогазли ферментация чиқиндиси (шлами) асосида органик ўғит тайёрлаш ва буғдой ўсимлигининг ривожланишига таъсирини лаборатория шароитида баҳолаш.

**Тадқиқотнинг объекти** сифатида балансланган маҳаллий мезофил ва термофил метаноген микроорганизмлар ассоциациялари (БМММА ва БТММА), қорамол гўнги (ҚГ), товуқ гўнги (ТГ), тамаки кукуни (ТК), *Lactobacillus plantarum* K04.84 штамми, органик ўғит (ОЎ) ва буғдой ўсимлиги ҳисобланади.

**Тадқиқотнинг предмети** сифатида биогаз ҳосил қилувчи маҳаллий мезофил ва термофил метаноген ассоциацияларини ажратиб олиш, биогазли ферментацияда қатнашувчи микроорганизмларни физиологик гуруҳларини аниқлаш ҚГ, ТГ ва ТК дан биогаз ҳосил қилишини ва ОЎ ни буғдой

ўсимлиги ривожланишига таъсирини аниқлаш ҳамда амалий синовлардан ўтказишдан иборат.

**Тадқиқотнинг усуллари.** Тадқиқотларни бажариш жараёнида микробиологик, биотехнологик, молекуляр-генетик, спектрофотометрик ва биометрик усуллардан фойдаланилган.

**Тадқиқотнинг илмий янгилиги** куйидагилардан иборат:

қорамол гўнгини босқичма-босқич биогазли ферментацияси асосида маҳаллий балансланган мезофил ва термофил метаноген фаол микроорганизмлар ассоциациялари ажратиб олинган ва маҳаллий балансланган метаноген мезофил ва термофил микроорганизмлар ассоциациялари қорамол гўнгидан 63,8% ва товуқ гўнгидан 69,7% метан ҳосил қилиши аниқланган;

илк бор маҳаллий метаноген термофил микроорганизмлар ассоциацияси таркибидаги метан ҳосил қилувчи бактериялар вакиллари молекуляр-генетик усулда аниқланди ва улар *Methanosarcina*, *Methanoculleus*, *Methanocorpusculum* ва *Methanospirillum* авлодларига мансуб 9 турга мансуб эканлиги асосланган;

илк бор маҳаллий *Lactobacillus plantarum* K04.84 штаммини товуқ гўнги таркибидаги патоген *Salmonella* авлоди бактерияларига қарши антагонистик хусусияти биогазли ферментация жараёнида аниқланган;

товуқ гўнги асосида биогазли ферментация қилиб олинган ОЎни 0,5 т/га ва NPK-30% миқдорида қўлланилганда буғдойни ривожланишига давомли таъсир қилиши аниқланган. Тажриба вариантыда буғдой ризосферасидаги спора ҳосил қилувчи аммонификацияловчи бактерияларнинг ҳужайраси вегетатив шаклида учраши ҳамда уларнинг 2-3% спора ҳолида бўлиши, назорат вариантыда эса уларнинг 37-40% спора эканлигига асосланган.

**Тадқиқотнинг амалий натижалари** куйидагилардан иборат:

Ажратиб олинган маҳаллий балансланган мезофил ва термофил метаноген микроорганизмлар ассоциациялари қишлоқ хўжалиги чиқиндиларидан биогаз олишда муҳим аҳамиятга эгалиги очиқ берилган.

**Тадқиқот натижаларининг ишончлилиги** барча тажрибалар уч такрорий нисбатда олиб борилиб, қийматларнинг ўртачаси ва стандарт хатолик (SE) Microsoft Excel (Microsoft корпорацияси, АҚШ) дастурида ҳисобланган. Олинган натижаларнинг  $P < 0,05$  да назорат қийматидан ишончли фарқ қилиши ANOVA дастури дастури ёрдамида таҳлил қилинган.

**Тадқиқот натижаларининг илмий ва амалий аҳамияти.** Тадқиқот натижаларининг илмий аҳамияти босқичма-босқич танлаш асосида олинган БМММА ва БТММА қорамол гўнгини биогазли ферментация қилишда 63,8% гача метан ҳосил қилиши, товуқ гўнгидан 69,7% гача метан олиш имконини берган. Танлаб олинган *Lactobacillus plantarum* K04.84 штаммини товуқ гўнги таркибидаги патоген бактерияларга қарши биотехнологик зарарсизлантириш усули ишлаб чиқилган. Олинган натижалар қишлоқ хўжалиги ва органик

чиқиндиларнинг микробиологик қайта ишлашга йўналтирилган илмий тадқиқотларнинг ривожига катта ҳисса қўшиши билан изоҳланган.

Тадқиқот натижаларининг амалий аҳамияти ажратиб олинган БМММА ва БТММА Республикамиздаги чорвачилик, паррандачилик фермалари гўнглари ва органик чиқиндиларни биогазли ферментациясини тезлаштирувчи ва самарадорлигини оширувчи бошланғич инокулят сифатида фойдаланиш учун асос бўлиб хизмат қилади.

**Тадқиқот натижаларини жорий қилиниши.** Босқичма-босқич танлаш йўли билан олинган балансланган метаноген микроорганизмлар ассоциацияларини олиш бўйича олинган илмий натижалар асосида:

қорамол гўнгини босқичма-босқич бижғитиш усули орқали олинган балансланган метан ҳосил қилувчи микроорганизмлар ассоциацияси асосида биогаз олиш биотехнологияси Наманган вилояти Тўрақўрғон тумани “Улуғбеклар” хусусий фермер хўжалигида жорий этилган (Ўзбекистон Республикаси Қишлоқ ва сув хўжалиги вазирлигининг 2017 йил 10 октябрдаги 02/12-533-сон маълумотномаси). Натижада қорамол гўнгини бижғитишда 60-63% метан гази ҳосил қилиши имконини берган.

қорамолчилик фермаларида гўнгдан биогаз олиш биотехнологияси Тошкент вилояти Паркент тумани “Бахт” фермер хўжалигида жорий этилган (Ўзбекистон Республикаси Қишлоқ ва сув хўжалиги вазирлигининг 2017 йил 10 октябрдаги 02/12-533-сон маълумотномаси). Натижада балансланган метан ҳосил қилувчи микроорганизмлар ассоциацияси биогазли ферментация жараёнини кескин тезлаштириб, биогаз таркибидаги метан миқдори назоратга нисбатан 3-4 марта ошириш имконини берган.

**Тадқиқот натижаларининг апробацияси.** Тадқиқот натижалари, жами 16 та, жумладан, 5 халқаро ва 11 республика илмий-амалий конференцияларда муҳокама қилинган.

**Тадқиқот натижаларининг эълон қилиниши.** Диссертация мавзуси бўйича жами 25 та илмий иш нашр этилган, шулардан 9 таси Ўзбекистон Республикаси Олий аттестация комиссиясининг докторлик диссертациялар асосий илмий натижаларини чоп этиш учун тавсия этилган илмий нашрларда, жумладан 7 таси республика ва 2 таси хорижий илмий журналларда нашр этилган.

**Диссертациянинг тузилиши ва ҳажми.** Диссертация таркиби кириш, бешта боб, хулоса, фойдаланилган адабиётлар рўйхати ва иловалардан иборат. Диссертациянинг ҳажми 113 бетни ташкил этган.

## **ДИССЕРТАЦИЯНИНГ АСОСИЙ МАЗМУНИ**

**Кириш** қисмида ўтказилган тадқиқотларнинг долзарблиги ва зарурияти асосланган, тадқиқотнинг мақсади ва вазифалари, объект ва предметлари тавсифланган, республика фан ва технологиялари ривожланишининг устувор йўналишларига мослиги кўрсатилган, тадқиқотнинг илмий янгилиги ва амалий натижалари баён қилинган, натижаларнинг илмий ва амалий

аҳамияти очиб берилган, тадқиқот натижаларини амалиётга жорий қилиш, нашр этилган ишлар ва диссертация тузилиши бўйича маълумотлар келтирилган.

Диссертациянинг «**Биогаз ҳосил бўлишида иштирок этувчи микроорганизмлар, физик-кимёвий омилларнинг биогаз ҳосил бўлишига таъсири, метаногенез жараёнида органик чиқиндилардан биогаз ҳосил бўлиши ва унинг таркиби ҳамда микроорганизмлар культураларини сақлаш тўғрисида адабиёт манбаларининг шарҳи**» деб номланган биринчи бобда келтирилган адабиётлар асосида биогаз ҳосил бўлишида иштирок этувчи микроорганизмлар ҳамда биогаз ҳосил бўлишига физик-кимёвий омиллар, органик чиқиндиларда биогаз ҳосил бўлиши ва унинг таркиби тўғрисида маълумотлар келтирилган.

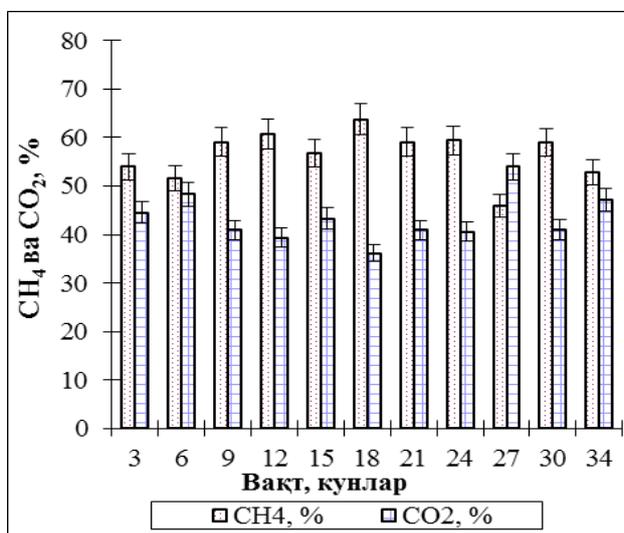
Диссертациянинг «**Балансланган мезофил ва термофил метаноген микроорганизмлар ассоциацияларини ўстириш шароитларини оптималлаштириш ва аналитик таҳлил қилиш усуллари**» деб номланган иккинчи бобда БМММА ва БТММАлар таркибидаги микроорганизмлар учун оптимал озуқа муҳитлари ва ўстириш шароитларини танлаш усуллари кўрсатиб ўтилган. БМММА иштирокида қорамол, товук гўнги ва тамаки кукунидан фойдаланиб биогазли ферментация динамикасида оксил, рН, титрланувчи умумий органик кислоталар, ацетат, умумий азот ва биогаз таркибидаги  $\text{CH}_4$ ,  $\text{CO}_2$  ва  $\text{N}_2$  миқдорларини аниқлаш усуллари баён этилган.

Диссертациянинг «**Балансланган мезофил ва термофил метаноген микроорганизмлар ассоциацияларини олиш**» деб номланган учинчи бобда қорамол гўнгини босқичма-босқич биогазли ферментация қилиш натижасида БМММА ва БТММА ажратиб олинган. Тадқиқотларимизда балансланган метаноген микроорганизмлар ассоциацияларини олишнинг биринчи босқичида 4 л (намлиги 90%) қорамол гўнги (ҚГ) суспензиясига қушхонадан олиб келинган қорамол ошқозонида тўла ҳазм бўлмаган 3 л озуқа билан аралаштирилди ва биогазли ферментация  $35^\circ\text{C}$  ҳароратда 10 л анаэроб ферментёрда олиб борилди. Тажрибанинг биринчи босқичида қорамол гўнгини биогазли ферментация натижасида умумий биогаз ҳажми  $26 \text{ дм}^3$  ташкил қилиб, метаннинг энг юқори миқдори 37% бўлиши аниқланган. Тажрибанинг иккинчи босқичида 7л ҚГга биринчи босқичдаги микроорганизмлар ассоциациясидан 20% инокулят қўшиб олиб борилди. Барча органик субстратларнинг бижғишининг асосий маҳсулоти ацетат ҳисобланади ва у метан ҳосил қилувчи бактериялар учун субстрат бўлиб ҳисобланади. Бижғиётган муҳитда метан ҳосил қилувчи бактериялар кўпайтириш мақсадида 1 г/л ҳисобида натрий ацетат қўшилган. Иккинчи босқичда биогазли ферментация давомидаги метаннинг миқдорлари энг фаол 3 та нуқталарда, яъни 7; 13 ва 18 кунларда  $\text{CH}_4$  миқдорлари мос равишда 42, 55,2% ва 53% етиши аниқланган ва умумий биогаз ҳажми  $54 \text{ дм}^3$  ташкил қилган. Учинчи босқичга иккинчи босқичдан 20% инокулят қўшилганда  $\text{CH}_4$ нинг 4 та юқори нуқталари аниқланган бўлиб, биогазли ферментациянинг 7, 14, 22 ва 31 кунларига тўғри келган ва  $\text{CH}_4$ нинг миқдорлари мос равишда

51,1; 55,2, 53% ва 58% етганлиги аниқланган. Тажрибада умумий биогаз миқдори 65,7 дм<sup>3</sup> ташкил қилган. Маълумки ҚГни бижғиш жараёнида рН қиймати муҳим аҳамиятга эга. Учинчи босқичда олинган метаноген микроорганизмлар ассоциацияси ишқорий шароитларда қай даражада метан ҳосил қилиш имкониятини аниқлаш мақсадида тўртинчи босқичда рН қиймати 8,5 бўлган ҚГдан фойдаланилган. Тўртинчи босқичга учинчи босқичдан олинган метаноген микроорганизмлар ассоциациясидан 20% инокулят қўшилганда ферментациянинг 12 ва 18 кунларида СН<sub>4</sub>нинг энг юқори миқдорларга етганлиги аниқланган бўлиб, мос равишда 60,7 ва 63,8% ташкил қилган (1-расм). Олиб борилган тадқиқотларнинг тажриба варианты натижалари шуни кўрсатдики, ҚГни биогазли ферментацияси динамикасида СО<sub>2</sub> ҳосил бўлишининг 4 та энг юқори нуқталари қайд этилган. Улар ферментациянинг 6, 15, 27 ва 34 кунларига тўғри келиши кузатилган ва уларнинг миқдорлари мос равишда 48,2, 43,3, 54% ва 47,1% эканлиги аниқланган. Эътиборли жиҳати шундаки, биогазли ферментация динамикасида биогаз таркибидаги СО<sub>2</sub> миқдорининг камайиши билан СН<sub>4</sub> миқдорини ошиб бориши аниқланган.

Шундай қилиб, ўтказилган тадқиқотлардан қуйидагилар аниқланган. Тажрибанинг назорат вариантыда ҚГни биогазли ферментация натижасида биогаз таркибида СН<sub>4</sub>нинг энг юқори миқдори 37,7% дан ошмаганлиги аниқланган. ҚГга 20% БМММА инокуляти қўшилган тажриба вариантыда назорат вариантдан фарқли равишда биогаз таркибида СН<sub>4</sub>нинг миқдори 1,7 ва 1,8 марта ортиқ бўлиб энг юқори миқдорларга (60,7 ва 63,8%) етиши аниқланган. Тажрибанинг 4 босқичдаги биогаз ҳосил бўлиши фаоллиги ва биогаз таркибида метаннинг миқдори юқори бўлганлиги, учинчи босқичда балансланган мезофил метаноген микроорганизмлар ассоциацияси (БМММА) шаклланганлигини кўрсатди. Шунинг учун БМММАни тадқиқотларимизда бошқа субстратлардан метан газига бойиган биогаз олиш учун бошланғич инокулят сифатида қўллашни кейинги тадқиқотларимизга асос қилиб олинган.

Метан ҳосил қилувчи бактериялар бижғитувчи бактерияларга нисбатан секин ривожланганлиги сабабли биогаз ҳосил бўлишидан аввал муҳитда учувчан ёғ кислоталар йиғилади. Шу сабабли ҚГни биогазли ферментацияси динамикасида титрланувчи умумий органик кислоталар ва ацетат миқдорлари ҳамда рН кўрсаткичи аниқланган. ҚГни биогазли



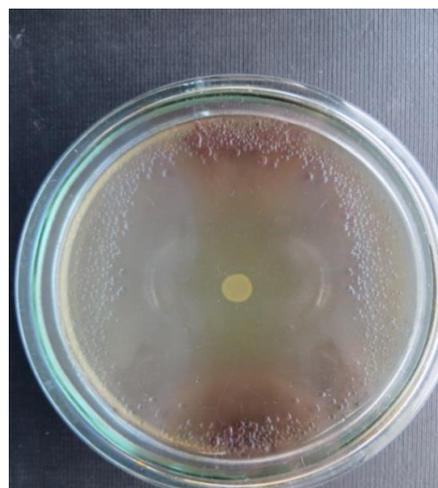
1-расм. ҚГ га 20% метаноген микроорганизмлар ассоциацияси инокуляти қўшилганда биогаз таркибидаги СН<sub>4</sub> ва СО<sub>2</sub> ни биогазли ферментация динамикасида ўзгариши.

ферментациясининг 6, 12 ва 21 кунларида ацетат ҳосил бўлишининг юқори нукталари қайд этилган ва уларнинг миқдорлари мос равишда 3,32, 4,94 ва 7,98 мг/мл ни ташкил қилган. Ўтказилган тадқиқотлар шуни кўрсатдики, ҚГни бижғиш жараёнида ацетатнинг кам миқдори биогаз таркибидаги  $\text{CH}_4$  миқдорининг юқори бўлиши билан (63,8%) ўзаро боғлиқ эканлиги аниқланган. ҚГни бошланғич рН қиймати кучсиз ишқорий муҳитдан 8,5 ферментациянинг 6 кунда нейтрал 7,0 кўрсаткичга келиши ва ферментациянинг охирига қадар унинг кўрсаткичи 7,2-7,6 оралиғида бўлиб, кескин даражада ўзгармаганлиги яъни балансланганлиги аниқланган. Биогазли ферментация даврида умумий титрланувчи органик кислоталарнинг юқори миқдори дастлабки 6 кун давомида кузатилиб унинг миқдори 18,8 мг/мл га етганлиги аниқланган ва шу вақтдан бошлаб биогаз таркибида метан миқдори ошиб бориб, ферментациянинг 18 кунда энг юқори миқдорга (63,8%) етганлиги аниқланган. Ферментациянинг кейинги кунларида титрланувчи умумий органик кислоталар миқдори сезиларли даражада ўзгармаган.

ҚГни мезофил шароитда биогазли ферментацияси динамикасида спора ҳосил қилувчи ва спора ҳосил қилмайдиган целлюлоза парчаловчи, метан ҳосил қилувчи, анаэроб аммонификаторлар, шу билан бирга *Enterobacteriaceae* оиласига мансуб *Escherichia coli*, *Salmonella* авлоди ва *Staphylococcus*, *Pseudomonas* авлодлари бактерияларининг умумий миқдорлари аниқланган. Целлюлоза парчаловчи бактериялар сонининг энг юқори миқдори бижғишнинг 21 кунларига тўғри келиб,  $0,75 \times 10^6$  хуж/мл ни ташкил қилиши аниқланган. Ферментация жараёнида метан ҳосил қилувчи бактерияларнинг миқдори 15 ва 21 кунлар оралиғида юқори  $7,5 \times 10^3$  хуж/мл бўлганлиги ва бу метан ҳосил бўлишининг ҳам энг юқори кўрсаткичига мос келганлиги аниқланган.

Анаэроб аммонификатор бактерияларнинг миқдори ферментациянинг 18 кунидан кейин камайиб бориши аниқланган. *Enterobacteriaceae* оиласига мансуб бактерияларнинг умумий хужайра титри тажрибанинг 21 кунидан кейин камайганлиги кузатилган. Бу даврга келиб патоген *Salmonella* авлоди вакиллариининг хужайра титри ҳам камайиши аниқланган. Таъкидлаш жоизки, ҚГни мезофил шароитда 20-21 кундан ортиқ биогазли ферментация қилиш *Salmonella* авлоди вакиллариини камайишига олиб келиши ва биогаз чиқиндисини бўлган органик субстратни ОЎ сифатида ишлатиш мумкинлиги аниқланган. Маълумки, мезофил шароитда ҚГ ва ТГни биогазли ферментацияси жараёнида барқарор биогаз олиш мақсадида биогаз қурилмасига ҳар 2-3 кунда янги 10-15% миқдорда ҚГ ва ТГ суспензияси қўшилади ва ундан шунча миқдорда органик субстрат чиқариб олинади ҳамда олинган субстрат ОЎ сифатида қўлланилади. Лекин бундай ўғит *Salmonella* авлоди бактериялари билан ифлосланганлиги боис атроф-муҳит ва тупроқда иккиламчи контаминацияни вужудга келтиради.

Шу сабабли уларнинг титрини органик субстрат таркибида камайтириш учун ЎзР ФА Микробиология институти “Пробиотиклар микробиологияси ва биотехнологияси” лабораториясида мавжуд бўлган *Lactobacillus plantarum* штамлари орасидан *Salmonella* авлоди бактерияларига қарши юқори антагонистик фаолликка эга бўлган бактериялар скрининги ўтказилди. Натижада, антагонистик энг фаол *L.plantarum* K04.84 штамми танлаб олинган ва 37°C ҳароратда 24 соат ўстирилгандан сўнг *Salmonella sp.* бактериясини ингибирлаши, 30 мм диаметрда ўсишига йўл қўймаганлиги ва юқори антагонистик фаолликни намоён қилганлиги аниқланган (2 расм).



2-расм. *Salmonella sp.* бактерияси ўсиши ва ривожланишига *L.plantarum* K04.84 штаммининг антагонистик фаоллиги

Кейинги тадқиқотларимизда *L.plantarum* K04.84 штаммининг антагонистик фаоллигини биогазли ферментация жараёнида текшириш учун ТГ суспензиясига *L.plantarum* K04.84 штамми суспензиясини турли хил нисбатларда бирга қўшиб 37°C да 3 кун давомида ферментация қилинди.

1-жадвал.

*Lactobacillus plantarum* K04.84 штаммини *Salmonella sp.* авлоди бактериясини биогазли ферментация жараёнида ўсиши ва ривожланишига антагонистик хусусияти

<i>Lactobacillus plantarum</i> K04.84 ( $1 \times 10^9$ КХБ/мл) штамми КС нинг товуқ гўнги билан нисбати	<i>Salmonella sp.</i> бактерияси хужайралари сони, КХБ/мл			<i>Lactobacillus plantarum</i> K04.84 штаммининг хужайра титри, КХБ/мл (3 кундан сўнг)
	Бошланғич	1 кундан сўнг	3 кундан сўнг	
1 мл / 200 мл (1:200)	$6,0 \times 10^6$	$5,0 \times 10^6$	$3,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^3$
2 мл / 200 мл (1:100)	$6,0 \times 10^6$	$4,0 \times 10^3$	$2,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^4$
3 мл / 200 мл (1:66)	$6,0 \times 10^6$	$5,0 \times 10^3$	0	$1,0 \times 10^6$
5 мл / 200 мл (1:40)	$6,0 \times 10^6$	$4,0 \times 10^3$	0	
10 мл / 200 мл (1:20)	$6,0 \times 10^6$	$4,0 \times 10^2$	0	
15 мл / 200 мл (1:13)	$6,0 \times 10^6$	$3,0 \times 10^2$	0	

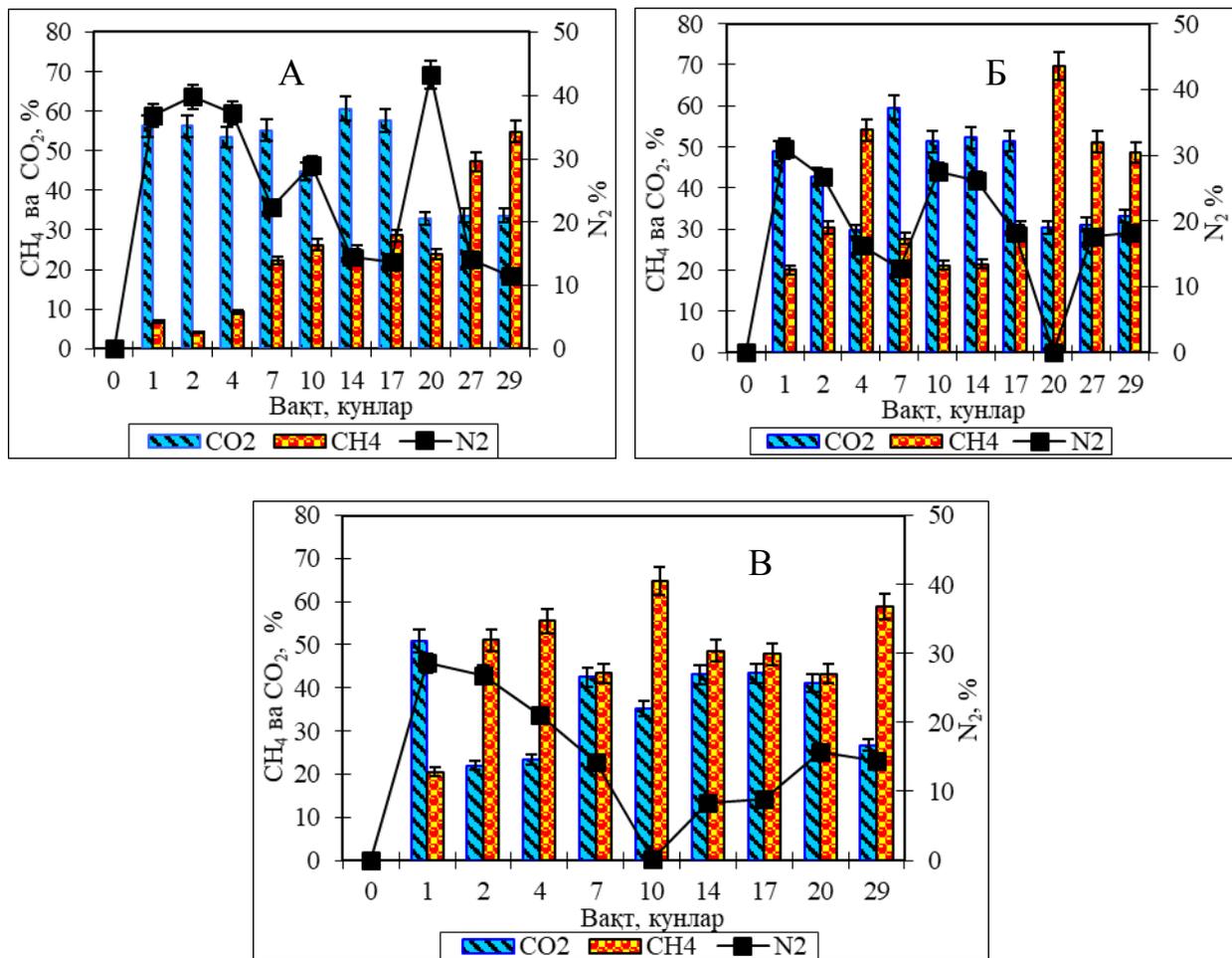
Натижада, 1-жадвалда кўрсатилганидек *L. plantarum* K04.84 штамми ТГ суспензиясига 1/100 ҳажм нисбатда қўлланилган вариантда 1 кундан сўнг *Salmonella sp.* бактерияси титрини  $6,0 \times 10^6$  дан  $4,0 \times 10^3$  га, 3 кундан сўнг  $2,0 \times 10^2$  гача камайтириши аниқланган.

Ўтказилган тажрибамизда *L. plantarum* K04.84 штаммининг хужайра титри биогазли ферментациянинг 3 кундан сўнг 1:200 нисбатда қўлланилган вариантда  $1,0 \times 10^3$  КХБ/мл ни, 1:100 нисбатда  $1,0 \times 10^4$  КХБ/мл ни, 1:66, 1:40, 1:20, 1:13 нисбатларда  $1,0 \times 10^6$  КХБ/мл га етганлиги аниқланган.

Тажрибаларимизда *L. plantarum* K04.84 штамми суспензиясини ТГ суспензиясига 1:66 ҳажм нисбатда ва ундан кам бўлмаган нисбатларда қўллаб, 3 кун давомида ферментация қилиш *Salmonella sp.* бактериясини тўлиқ нобуд бўлишига олиб келиши аниқланган. Ўтказилган тадқиқотлар натижасида органик чиқиндиларни *Salmonella sp* бактериясидан зарарсизлантиришнинг биотехнологик усули ишлаб чиқилган.

Органик чиқиндиларни анаэроб ферментация қилишни таҳлил қилиб ўрганишлар натижасида техникавий, экологик ва иқтисодий самарадор усул бу термофил шароитларда биогаз олиш ҳисобланади. Термофил шароитларда юқори самарали микроорганизмлар билан биргаликда биогазли ферментация даврини мезофил шароитларга нисбатан 5-7 кунгача қисқартиришга имкон беради бу эса биогаз қурилмаларини ҳажмини 5-6 баробар кичиклашишига ва унга кетадиган қурилиш ашёларини сарфини камайишига олиб келади. Шунинг учун кейинги тадқиқотларимизда тажрибалар термофил (55°C) шароитларда амалга оширилган.

Термофил шароитда (55°C) ТГ га 10% ва 20% БТММА инокуляти қўшилган ҳамда қўшилмаган назорат вариантларда биогаз таркибидаги  $\text{CH}_4$  нинг ҳосил бўлиши ферментациянинг биринчи кунидан бошланганлиги аниқланган (3-расм А, Б ва В). Аммо, биринчи кундаги тажриба ва назорат вариантларидаги  $\text{CH}_4$ нинг миқдорлари таққосланганда, тажриба вариантларида 2,9 марта юқори эканлиги аниқланган. Шунингдек, ТГни табиий микроорганизмлар ассоциацияси билан биогазли бижғитиш жараёнида биогаз таркибидаги  $\text{CH}_4$ нинг энг юқори миқдори ферментациянинг 29 кунига тўғри келиб 54,8% ни ташкил қилган (3-расм, А). Лекин, ТГга 10% ва 20% БТММА инокуляти қўшилган тажриба вариантларида  $\text{CH}_4$  нинг миқдорлари ферментациянинг тўртинчи кунда мос равишда 54,1% ва 55,5% га етиши аниқланган (3-расм, Б ва В). Таъкидлаш жоизки, ТГга 10% ва 20% БТММА инокуляти қўшилган тажриба вариантларида биогаз таркибида  $\text{CH}_4$  нинг максимал ҳосил бўлиши ферментациянинг 10 ва 20 кунларида кузатилган ва унинг миқдорлари мос равишда 64,7% ва 69,7% ни ташкил қилган. Шунингдек, ТГга 10% БТММА инокуляти қўшилган Б вариантда, назорат вариантдан фарқли равишда, биогаз таркибидаги  $\text{CH}_4$  нинг иккита юқори нуқталари аниқланган бўлиб, улар ферментацияси динамикасининг 4 ва 20 кунлари қайд этилиб, мос равишда 54,1% ва 69,7% га етиши аниқланган (3- расм Б). ТГга 20% БТММА инокуляти қўшилган В вариантда биогаз таркибидаги  $\text{CH}_4$  ҳосил бўлишининг учта юқори нуқталари аниқланган бўлиб, улар ферментациянинг 4, 10 ва 29 кунларига тўғри келган ва унинг миқдори мос равишда 55,5, 64,7% ва 58,7% га етганлиги аниқланган (3-расм В). ТГни биогазли ферментациясининг дастлабки кунларида, назорат ва тажриба вариантларида ҳам  $\text{CO}_2$  ва  $\text{N}_2$  миқдорларини юқори бўлиши қайд этилган. Шу билан бирга ферментация жараёнида, назорат ва тажриба вариантларида ҳам биогазнинг фаол ҳосил бўлиш вақти билан метаннинг максимал ҳосил бўлиши вақтига мос келмаган.



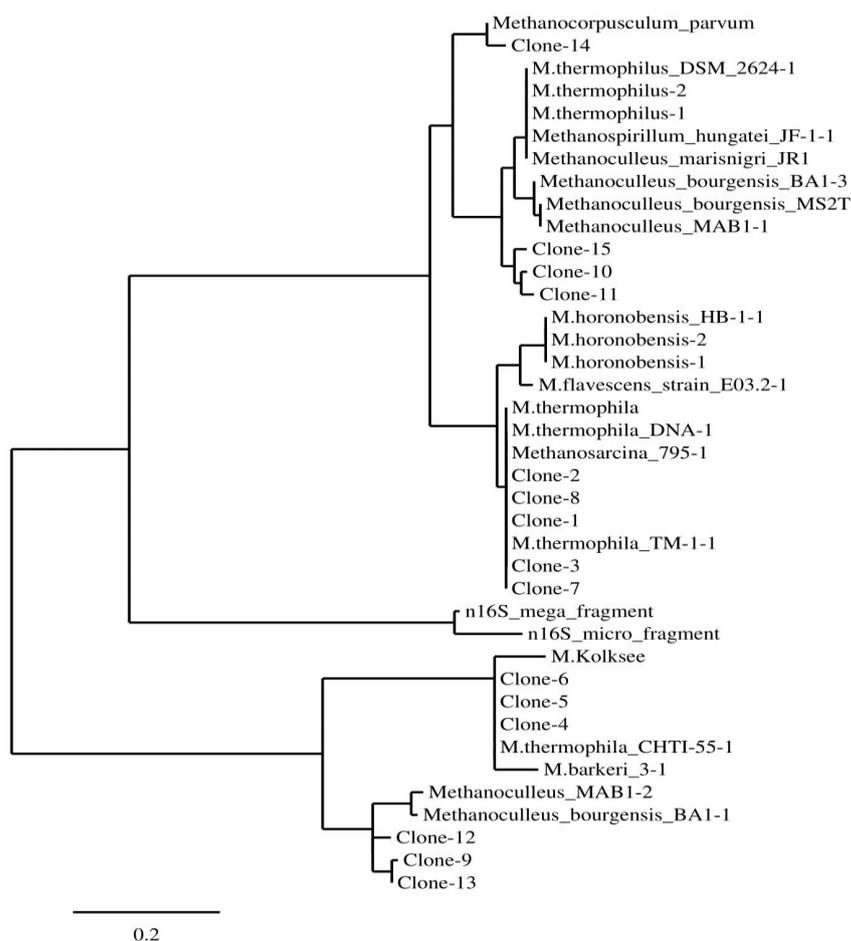
3–расм. Термофил шароитда ТГ ни биогазли ферментацияси динамикасида CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub> ва N<sub>2</sub> микдорларининг ўзгариши: А – ТГ табиий микрофлораси (назорат), Б – ТГ га 10% БТММА инокуляти қўшилган (тажриба) ва В – ТГ га 20% БТММА инокуляти қўшилган (тажриба).

Термофил шароитда ҳам ТГни биогазли бижғитиш жараёнида CO<sub>2</sub> миқдорининг пасайиши ва метан ҳосил бўлишининг ортиши ўртасида муайян корреляция борлиги аниқланган. Шунингдек, ТГни бижғитиш жараёнига БТММАнинг 10% ва 20% инокуляти қўшилган вариантларда ферментациянинг 10 ва 20 кунларида биогаз таркибидаги азот ўзлаштирилиши юқори кўрсаткичларга эга бўлиб, у метаннинг максимал ҳосил бўлиши билан биргаликда содир бўлиши аниқланган (3-расм, Б ва В). Шундай қилиб, термофил шароитда ТГга БТММА ни инокулят сифатида қўлланилиши биогаз таркибида юқори миқдорда CH<sub>4</sub> ҳосил бўлишини таъминлаши аниқланган. Термофил шароитда ТГни биогазли ферментациясидан олдин, икки кундан сўнг ва якуний босқичларида метан ҳосил қилувчи, анаэроб целлюлоза парчаловчи, анаэроб азотфиксаторлар, денитрификацияловчи ва аммонификацияловчи бактериялар шу билан бирга, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* ва *Enterobacteriaceae* оиласининг *Shigella* ва *Salmonella* авлодига мансуб бактерияларнинг хужайра титри аниқланган. Тадқиқот натижаларига кўра, ТГда асосан *Enterobacteriaceae* оиласига мансуб бактериялар доминантлик қилиб, уларнинг хужайра титри  $6,0 \times 10^6$  хуж/мл ни ташкил қилган. *Enterobacteriaceae*

оиласига мансуб бактериялар ичида миқдори бўйича доминантлик *Escherichia coli* бактерия турига тўғри келиб, унинг хужайра титри  $4,6 \times 10^7$  КХБ/мл ни ташкил қилган. ТГда *Shigella* ва *Salmonella* авлодига мансуб бактериялар миқдори мос равишда  $1,8 \times 10^5$  ва  $5,0 \times 10^4$  КХБ/мл ни ташкил қилган. ТГни ферментациясидан олдин ва кейин *Pseudomonas aeruginosa* ва *Staphylococcus aureus* миқдорлари ҳам аниқланган бўлиб, ферментациядан олдин уларнинг миқдори мос равишда  $2,0 \times 10^4$  ва  $2,0 \times 10^3$  КХБ/мл ни ташкил қилган. Тадқиқотлар натижасида биогазли ферментациянинг 2-кунидан сўнг, БТММАнинг 10% инокуляти қўшилган тажриба вариантыда метан ҳосил қилувчи бактерияларнинг миқдори назоратга нисбатан 20 баробарга кўпайиб,  $5,0 \times 10^4$  хуж/мл ни ташкил қилганлиги аниқланган. Целлюлоза парчаловчи ва анаэроб азотфиксатор бактерияларнинг титри назоратга нисбатан 2 ва 1,19 баробарга кўп бўлиб,  $5,0 \times 10^6$  хуж/мл ва  $2,5 \times 10^4$  ни ташкил қилган. Термофил шароитларда ТГ таркибидаги *Enterobacteriaceae* оиласининг *Shigella* ва *Salmonella* авлодига мансуб патоген бактериялар гельминтлар биогазли ферментациясининг 2-кунидан сўнг тўлиқ нобуд бўлиши аниқланган. Демак, термофил шароитда ТГ асосида олинган ОЎ кишлоқ хўжалиги экинларига ишлатиладиган ўғитларга қўйиладиган Давлат стандартларининг микробиологик қисмига қўйиладиган талабларига тўлиқ жавоб беради.

Кейинги тадқиқотларда БТММА таркибидаги метан ҳосил қилувчи бактерияларнинг аниқлаш учун уларнинг умумий ДНКси ажратиб олинган ва метан ҳосил қилувчи бактериялар учун махсус дизайн қилинган Arch F2, Arch R1386 ҳамда Метил-коэнзим М-редуктаза (MCR) ферменти генини амплификация қилувчи ME1, ME2 ва MLf, MLg праймерлари ва универсал 16S rRNA праймерлари асосида ПЗР ўтказилган. Олинган ПЗР маҳсулотлари клонловчи векторига трансформация қилинди ва TOP10 *E.coli* компитент хужайраларига ўтказилди. ПЗР маҳсулотларини тутган 15 та клон ажратиб олинган. Клонлар махсус праймерлар билан секвенсланган ва секвенс натижалари NCBI маълумотлар базасида Blast гомологик таққосланган ҳамда юқори гомологияга эга бўлган бактериялар турлари аниқланган. Олинган натижалар асосида уларнинг филогенетик шажараси Fig Tree дастурида тузилган.

Тадқиқот натижаларга кўра термофил шароитда ўсаётган метан ҳосил қилувчи бактериялар *Methanosarcina thermophilus*, *Methanosarcina thermophila*, *Methanosarcina kolkse*, *Methanoculleus bourgensis*, *Methanosarcina horonobensis*, *Methanosprillum hungate*, *Methanosarcina barkeri*, *Methanosarcina flavescens*, *Methanocorpusculum parvum* турларига 99-100% ўхшашлиги ва 9 та турдан иборат эканлиги аниқланган (4-расм). Тадқиқот ишлари Геномика ва Биоинформатика институти билан ҳамкорликда амалга оширилган.

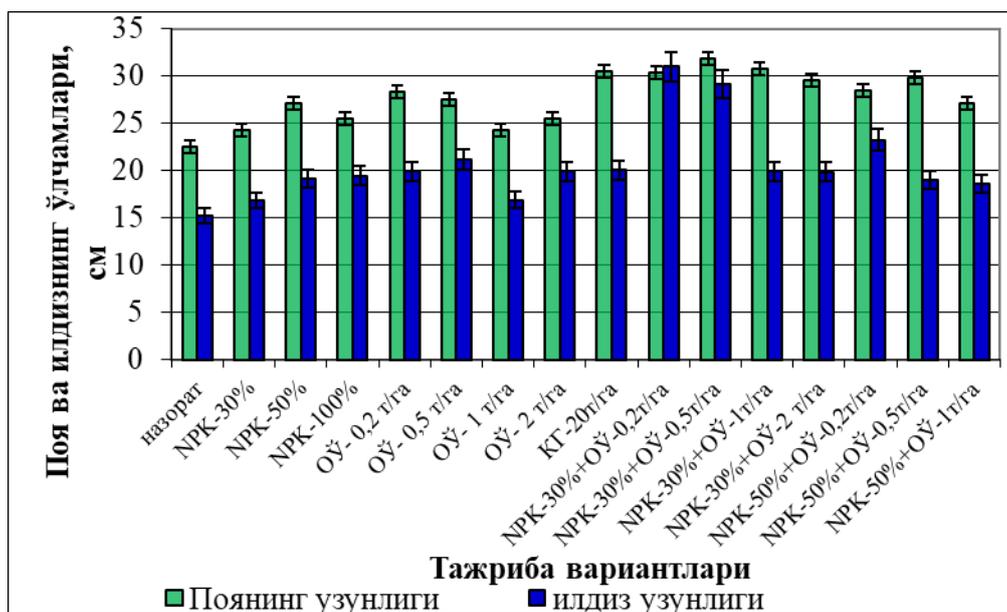


4-расм. Метан ҳосил қилувчи бактерияларнинг филогенетик шажараси

Диссертациянинг “**БМММА сақлаш усуллари**ни ўрганиш ва ишлаб чиқиш” деб номланган тўртинчи бобида олинган ассоциация таркибидаги турли физиологик гуруҳ микроорганизмларни биргаликда сақлаш усуллари ишлаб чиқиш бўйича натижалар келтирилган. Натижада, БМММА биогазли ферментация жараёнини амалга ошириши ва метан ҳосил қилиши хусусиятини сақлаб қолишининг энг яхши усули таркибида 0,5 г фосфорит уни ҳамда желатина+сахароза қўшилган химоя муҳитларидан фойдаланиш эканлиги кўрсатилган.

Диссертациянинг “**Буғдой ўсимлигига биогазли ферментация асосида олинган органик ўғитнинг таъсирини ўрганиш ва БМММА ва БТММА фойдаланиб биогаз олишни бошқариш параметрлари**” деб номланган бешинчи бобида ТГ асосида олинган ОЎни лаборатория шароитида (40 кун) турли меъёрларда буғдой ўсимлигига қўллаш ва метаноген микроорганизмлар ассоциациясидан фойдаланиб биогаз олишни бошқариш параметрларини ўрганишга бағишланган. Ўтказилган лаборатория тажрибаларида ТГ асосида олинган ОЎни ва минерал ўғитларни буғдойнинг ўсиши ва ривожланишига таъсири таққослаб ўрганилган. Олинган маълумотларга кўра мазкур ўғит кам меъёрларда (0,2 ва 0,5 т/га ОЎ + NPK 30%) буғдой поясининг ўсиши ва илдиз тизимининг ривожланишига давомли стимулловчи таъсир кўрсатган (5-расм). Аниқланишича, тупроқга 20 т/га ҳисобида ҚГ (назорат) солинганда буғдой поя ва илдизларининг узунлиги

тажрибанинг 0,2 т/га ОЎ + NPK 30% ва 0,5 т/га ОЎ + NPK 30% вариантларига нисбатан кам бўлган.

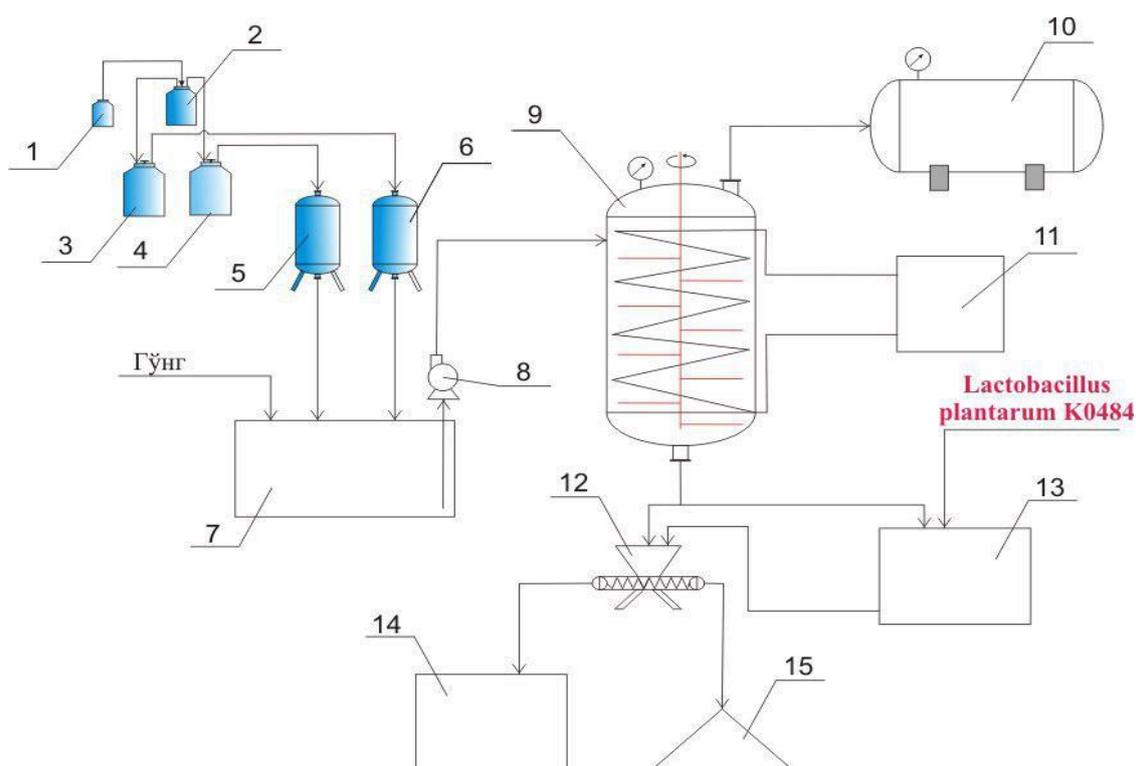


5-расм. Буғдойнинг поя ва илдизи ривожланишига турли микдордаги органик ўғит ва минерал ўғитлар комбинациясининг таъсири

Лаборатория шароитида ўтказилган тажрибаларда ТГ асосида олинган ОЎни 0,5 т/га + 30% NPK билан биргаликда қўллаш натижасида буғдой ўсимлигини ўсиши ва ривожланишига давомли таъсир қилиши аниқланган. Кам микдорда қўлланилган органико-минерал ўғитнинг буғдой ўсимлигини ўсиш ва ривожланишига давомли таъсирини кузатилиши, буғдой ўсимлиги ризосферасидаги спора ҳосил қилувчи аммонификацияловчи бактерияларнинг асосий қисми органико-минерал ўғит таъсирида вегетатив хужайра шаклида эканлиги ва уларнинг 2-3% спора ҳолида эканлиги ҳамда ОЎсиз назорат вариантыда эса буғдой ризосферасидаги спора ҳосил қилувчи аммонификацияловчи бактерияларнинг хужайраси 37-40% спора ҳолида сақланиши аниқланган. Тажрибаларга кўра, ТГни БТММА нинг 10% ва 20% инокулятидан фойдаланиб термофил бижғитишдан сўнг олинган ОЎда гумин кислоталарнинг микдори, назорат варианты билан солиштирилганда, 1,3 ва 1,6 баробарга ортиқ бўлган, яъни 18,9% дан 23,6% гача; ауксин 1,3 ва 1,4 баробарга, яъни 105 дан 115 мкг/г гача ; гиббереллин 1,2-1,5 баробарга, яъни 350-430 мкг/г бўлиши аниқланган. ОЎ таркибидаги фульвокислоталар микдорини назорат варианты билан солиштирилганда, фарқи катта бўлмади ва кул таркибидаги органико-минерал моддаларнинг умумий микдорига нисбатан 24,1% ва 24,5% ташкил қилган.

ҚГ ва ТГларини биогазли ферментация қилиш юзасидан олиб борилган лаборатория ва амалий тадқиқотлар асосида биогаз олишнинг принципиал технологик схемаси ишлаб чиқилган (6-расм) ва Тошкент вилояти Паркент тумани Қизилтоғ қишлоғида “Бахт” фермер хўжалигида 13 м<sup>3</sup> ҳажмли вертикал биогаз қурилмасида амалий синовдан ўтказилган.

Биореактордаги биогаз ҳосил бўлишини жадаллаштириш ва биогаз таркибида метан миқдорини ошириш мақсадида БМММАдан бошланғич инокулят сифатида фойдаланилган. Бунинг учун лиофил қурилган 5 гр БМММА препарати ҚГ суспензияси асосида тайёрланган озуқа муҳитига экилади ва 35°C ҳароратда 14 кун давомида босқичма-босқич 2,5, 10 ва 75 л ҳажмли анаэроустатларда биогазли ферментация қилиб кўпайтириб олинган (6-расм, 1-6). Кўпайтириб олинган БМММА суспензиясидан биореакторга юкланадиган субстрат умумий ҳажмига нисбатан 10% миқдорда инокулят сифатида олиниб биореакторда метан ҳосил бўлишини жадаллаштириш учун инокулят сифатида фойдаланилган.



6- расм. **Биогаз олишнинг принципал технологик схемаси.** 1 – БМММА нинг лиофил курук препарати (5 г); 2 – БМММАни 2,5 л анаэроустатда ўстириш; 3- 4 – БМММАни 10 л ҳажмли анаэроустатларда кўпайтириш; 5-6 – БМММАни 75 л ҳажмли анаэроустатларда биогазли ферментация қилиш; 7 – Биогазли ферментация учун гўнгли бўтқа тайёрлаш учун ховуз; 8 – тайёр бўлган гўнгли бўтқани биореакторга узатувчи насос; 9 – биогаз қурилмаси (13 м<sup>3</sup>); 10 – газгольдер; 11- биореакторни иситиш қурилмаси; 12 – сепаратор; 13 – *L. plantarum* K04.84 штамми билан гўнгни патоген бактериялардан зарарсизлантириш идиши; 14 – суюқ ўғитни йиғиш ховузи; 15 – қаттиқ фракцияли ўғитни йиғиш жойи.

Бунинг учун тайёрлаб олинган БМММА инокуляти насос ёрдамида биореакторнинг пастки қисмига юкланган ва дарҳол бир кун аввал тайёрланган 90% намликка эга бўлган ҚГ суспензияси ҳам насос ёрдамида биореактор ичидаги БМММАнинг устки қисмига юкланган ва барқарор биогаз олиш таъминланган (6-расм, 7-9).

Мезофил шароитда субстратнинг биореакторда биогазли ферментация қилиш вақти 30 кун бўлиши мумкин, лекин жараёни тезлаштириш ва тўхтовсиз биогаз олиш учун ҳар 2-3 кунда биореакторга 10% миқдорда янги

органик субстрат солинади ва шунча миқдорда чиқарилади. Биогаз газгольдерда тўпланган ва унинг таркиби таҳлил қилинган (6-расм, 10). Олинган биогаз қуйидаги таркибга: 60% CH<sub>4</sub>, 38% CO<sub>2</sub> ва бошқа газлар 2% гача бўлиб, CH<sub>4</sub> нинг миқдори субстрат таркиби ва технологияга қараб 55-65% оралиғида ўзгариб туриши аниқланган. Биореакторда керакли ҳароратни ушлаб туриш иситиш қурилмаси орқали амалга оширилган (6-расм 11). Биореактордаги мезофил шароитда қайта ишланган органик субстратни патоген миклофлорадан, яъни *Salmonella* авлодига мансуб бактериялардан зарарсизлантириш учун *L. plantarum* K04.84 штамми билан бирга ко-ферментация қилиш учун махсус идишга юборилган. Натижада 13 м<sup>3</sup> биореакторга ҳар 2-3 кунда 1 м<sup>3</sup> ҳажмда янги субстрат солинса шунча миқдордаги чиқариб олинган ва унга 15 л ҳисобида *L. plantarum* K04.84 штаммининг 10<sup>9</sup> КХБ/мл културал суюқлиги қўшилиб 37°Сда 3 кун давомида бирга ко-ферментация қилиниб, субстрат *Salmonella* авлоди бактерияларидан зарарсизлантирилган (6-расм 13). Зарарсизлантирилган ОЎ сепараторга юборилиб суюқ ва қуюқ фракцияларга ажратилган (6-расм 12, 14 ва 15). Ушбу биотехнологик схемада термофил шароитда биогазли ферментация олиб борилганда, патоген миклофлора, гельминтлар тухумлари ва бегона ўт уруғлари 55°С ҳарорат таъсирида тўлиқ нобуд бўлади ва *L. plantarum* K04.84 штамми билан шламни қайта ишлашга эҳтиёж қолмайди. Шундай қилиб, олиб борилган тадқиқотлар натижасида ҚГ ва ТГни биогазли ферментация қилишнинг экологик тоза ва самарадор биотехнологияси ишлаб чиқилган.

Ўтказилган амалий тажрибалардан биогаз олишнинг иқтисодий самарадорлиги ҳисоблаб чиқилган (2-жадвал). Бунда биогаз қурилмасига субстратни юклаш ва биореактор ичидаги субстратни аралаштириш учун сарфланган электр энергияси харажатлари ва бир ишчи кучининг ойлик маошини ҳисобга олган ҳолда ҳисоблаб чиқилган. Иқтисодий самардорликни ҳисоблашда ҳозирги вақтда электр энергияси 1квт/с-295сўм, кун давомида биореактордаги субстратни аралаштириш ва юклаш учун 24 квт/с энергия сарфланган. Биореактордаги биогаз м<sup>3</sup> да ҳисобланиб, унинг нарҳини эса 1 м<sup>3</sup> табиий газга нисбатан, яъни 380 сўмдан ҳисоблаб чиқилган.

2-жадвал.

13м<sup>3</sup> ли биореакторда биогаз олишнинг иқтисодий самарадорлиги

Субстратни аралаштириш ва юклаш, квт/соат, сўм		Ишчи кучи, сўм	Биогаз, м <sup>3</sup>	Биогаз, сўм	Жами харажатлар сўм	Соф даромад, сўм	
кун	3,0 квт/с	295*7080,00	36,666	380*150	57000,00	43746,00	13265,00
ой	720 квт/с	212400,00	1,100,000	4500	1710000,00	1312400,00	397960,00
йил	8640кв т/с	2544800,00	13,200000	1620000	20520000,00	1574448,00	4755200,00

Шундай қилиб 13 м<sup>3</sup> биогаз қурилмасида ҳосил бўлган биогаздан ойига 397960,0 сўм ва йилига 4755200,0 сўм миқдорида соф даромад олиш мумкин.

Бундан ташқари йилига 12 т қуритилган ва 110 тонна суяқ ҳолдаги ОЎ ишлаб чиқарилиши мумкин. Биогаз қурилмаларини ишга туширишда ажратиб олинган БМММА ва БТММАлардан фойдаланиш, биогаз ҳосил бўлишини тезлаштиришга, самарадорлигини ва биогаз таркибидаги метан миқдорини оширишга олиб келиши аниқланган.

## ХУЛОСА

«Фаол метан ҳосил қилувчи микроорганизмлар ассоциацияси асосида биогаз олиш» мавзусидаги диссертацияси бўйича олиб борилган тадқиқотлар натижасида қуйидаги хулосалар тақдим этилди:

1. Қорамол гўнгини босқичма-босқич биогазли ферментацияси асосида балансланган мезофил ва термофил метаноген микроорганизмлар ассоциациялари ажратиб олинган. Қорамол гўнгига 20% БМММА инокуляти қўшиб биогазли ферментация қилинганда қисқа лаг-фаза билан бошланиши ва биогаз таркибидаги  $\text{CH}_4$  миқдори 63,8% ни ташкил қилди.
2. Термофил шароитда (55°C) товук гўнгига 10 ва 20% БТММА инокулятини қўшиб ферментация қилиш биогаз таркибидаги  $\text{CH}_4$  миқдорини 64,7-69,7% ҳосил бўлишини таъминлаган. Ферментация динамикасида  $\text{CO}_2$  билан  $\text{CH}_4$  миқдорлари ўртасида ўзаро боғлиқлигини намоён қилади.
3. Мезофил шароитда 20 кундан кўп муддатда биогазли ферментация қилиш ичак таёқчаси ва салмонелла авлоди бактериялари титрини камайишига олиб келган бўлса, термофил шароитда (55°C) биогазли ферментация қилиш *Enterobacteriaceae* оиласи, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* ва *Shigella* авлодлари бактерияларини ферментациянинг 2-кунда тўлиқ нобуд бўлишидан далолат беради.
4. БТММА таркибидаги метан ҳосил қилувчи бактерияларнинг таксономик ҳолати молекуляр-генетик таҳлил асосида *Methanosarcina*, *Methanoculleus*, *Methanocorpusculum* ва *Methanospirillum* авлодига мансуб 9 та турдан иборатлиги қайд этилади.
5. *Lactobacillus plantarum* K04.84 штамми суспензиясини товук гўнги шлами билан 1:66 ҳажм нисбатда ко-ферментацияси *Salmonella sp.* бактериясига қарши юқори антагонистик фаоллигини намоён қилади.
6. БМММА таркибидаги муҳим физиологик микроорганизмлар гуруҳларининг фаол метан ҳосил қилиш хусусиятларини узоқ муддатли сақлаш учун 0,5 г фосфорит уни ҳамда желатина+сахароза қўшилган ҳимоя муҳитларидан фойдаланиб лиофил қуритиш параметрлари аниқланиши билан изоҳланади.
7. ТГ асосида олинган ОЎ 0,5 т/га миқдорда ва 30% NPK билан биргаликда буғдой ўсимлигига қўллаш буғдойнинг пояси ва илдиз тизимининг ривожланишига давомли ижобий таъсир қилиши аниқланган. Буғдой ўсимлигини ўсиш ва ривожланишига давомли таъсирини кузатилиши, буғдой ўсимлиги ризосферасидаги спора ҳосил қилувчи аммонификацияловчи бактерияларнинг асосий қисми органико-минерал ўғит таъсирида вегетатив хужайра шаклида бўлиб, уларнинг 2-3% спора ҳолида

эканлиги аниқланган. Оўсиз назорат вариантыда эса бугдой ризосферасидаги спора ҳосил қилувчи аммонификацияловчи бактерияларнинг хужайраси 37-40% спора ҳолида бўлиши қайд этилади.

**НАУЧНЫЙ СОВЕТ DSc.02/30.12.2019.В.38.01 ПО ПРИСУЖДЕНИЮ  
УЧЁНЫХ СТЕПЕНЕЙ ПРИ ИНСТИТУТЕ МИКРОБИОЛОГИИ  
ИНСТИТУТ МИКРОБИОЛОГИИ**

---

**ТАШБАЕВ ШЕРЗОДБЕК АБДУРАСУЛОВИЧ**

**ПОЛУЧЕНИЕ БИОГАЗА НА ОСНОВЕ АКТИВНОЙ  
МЕТАНОБРАЗУЮЩЕЙ АССОЦИАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ**

**03.00.12 – Биотехнология**

**АВТОРЕФЕРАТ ДИССЕРТАЦИИ ДОКТОРА ФИЛОСОФИИ (PhD)  
ПО БИОЛОГИЧЕСКИМ НАУКАМ**

**Ташкент-2020**

**Тема диссертации доктора философии (PhD) зарегистрирована в Высшей аттестационной комиссии при Кабинете Министров Республики Узбекистан за номером B2017.1.PhD/B42**

Диссертация выполнена в Институте Микробиологии.

Автореферат диссертации на трех языках (узбекском, русском, английском (резюме)) размещен на веб-странице Научного совета (microbio@academy.uz) и Информационно-образовательном портале «Ziynet» (www.ziynet.uz).

<b>Научный руководитель:</b>	<b>Алимова Барно Хасановна</b> кандидат биологических наук, старший научный сотрудник
<b>Официальные оппоненты:</b>	<b>Хўжамшукуров Нортожи Абдухаликович</b> доктор биологических наук, профессор
	<b>Расулов Бахтиёр Абдуғофурович</b> доктор биологических наук
<b>Ведущая организация</b>	<b>Самаркандский</b> государственный университет

Защита диссертации состоится «25» февраля 2020 года в «10<sup>00</sup>» часов на заседании Научного Совета DSc.02/30.12.2019.B.38.01 при Институте микробиологии (Адрес: 100128, г. Ташкент, Шайхонтохурский район, ул. А. Кадырий, 7б, конференц-зал Института микробиологии, 5 этаж Тел.: (+99871) 241-92-28, (+99871) 241-71-98, факс: (+99871) 241-92-71, 246-02-24, e-mail: [microbio@academy.uz](mailto:microbio@academy.uz)).

С диссертацией можно ознакомиться в Информационно-ресурсном центре Института микробиологии (зарегистрирована под № \_\_\_\_). Адрес: 100128, г.Ташкент, Шайхонтохурский район, ул. А. Кадырий, 7б, Административное здание Института микробиологии, 5-й этаж, библиотека. Тел.: (+99871) 241-92-28.

Автореферат диссертации разослан « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2020 года.  
(реестр протокола рассылки № \_\_\_\_ от « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2020 года).

**Арипов Тахир Фатихович**  
Председатель Научного совета по присуждению учёных степеней, б.ф.д., профессор, академик

**Жураева Рохила Назаровна**  
Ученый секретарь Научного совета по присуждению учёных степеней, к.б.н., старший научный сотрудник

**Гулямова Ташхан Гафуровна**  
Председатель научного семинара при Научном совете по присуждению учёных степеней, д.б.н., профессор

**ВВЕДЕНИЕ (аннотация диссертации доктора философии(PhD))**

**Актуальность и востребованность темы диссертации.** Одной из главных проблем ускоренного развития мировой экономики, особенно сельского хозяйства, является удовлетворение спроса на энергию. Положительное решение этой проблемы основано на разработке технологий, связанных с возобновляемыми источниками энергии. Широкомасштабное производство альтернативных источников энергии и их использование стабилизирует скорость накопления карбонат ангидрида в атмосфере и предотвращает его увеличение. В связи с этим, все более актуальным становится широкомасштабное применение в мире возобновляемых источников энергии имеющие большое научное и практическое значение.

В мировой практике ведутся научные исследования по получению альтернативных источников энергии с эффективным использованием природного потенциала. В частности, для получения биогаза в качестве органических субстратов используются отходы животноводческих хозяйств и птицеферм, остатки растений, отходы пищевой и лёгкой промышленности, бытовые отходы. Изучаются различные группы анаэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов с получением устойчивой сбалансированной метаногенной ассоциации осуществляющих процесс разложения органических веществ с образованием биогаза. Поэтому, создание безотходной производственной технологии в сельском хозяйстве, разработка новой биотехнологии для повышения эффективности процесса переработки отходов животноводческих и птицеферм имеет важное научное и практическое значение.

В Республике в секторе энергетики в основном уделяется огромное внимание разработке и внедрению в практику использования углеводородного сырья и источников возобновляемой энергии, а также достигаются определённые результаты по рациональному использованию возобновляемого сырья (отходов), и повышению эффективности получения биогаза и органического удобрения (ОУ). В Стратегии действий по дальнейшему развитию Республики Узбекистан поставлены задачи «...расширения использования возобновляемых источников энергии»<sup>1</sup>. При решении данных задач, в частности, получение биогаза с использованием сбалансированной метаногенной ассоциации микроорганизмов для сбраживания навоза животноводческих и птицеводческих фермерских хозяйств и разработка технологии использования обеззараженного от патогенных микроорганизмов органического удобрения ОУ, образованного после биогазовой ферментации, имеет важное значение.

Данное диссертационное исследование в определенной степени служит выполнению задач, предусмотренных Указом Президента Республики Узбекистан УП-4947 от 7 февраля 2017 года “О стратегии действий по дальнейшему развитию Республики Узбекистан” и Постановлении Президента Республики Узбекистан от ПП №3012 от 26 мая 2017 года О

---

<sup>1</sup> Указ Президента Республики Узбекистан УП-4947 от 7 февраля 2017 года «О Стратегии действий по дальнейшему развитию Республики Узбекистан».

программе мер по повышению энергоэффективности, развитию возобновляемых источников энергии, экономики и социальной сферы в 2017 - 2021 годы», а также других нормативно-правовых документах, принятых в данной сфере.

**Соответствие исследования приоритетным направлениям развития науки и технологий Республики.** Настоящая работа выполнена в соответствии с приоритетным направлением развития науки и технологии Республики Узбекистан V. «Сельское хозяйство, биотехнология, экология и охрана окружающей среды».

**Степень изученности проблемы.** Научная литература представлена результатами многих исследователей, работы которых посвящены анаэробному сбраживанию различных отходов с получением биогаза. Так например, такие исследования как значение гидролизующих и ацидогенных метаногенов при анаэробном разложении биомассы (Burak Demirel, 2008), современное состояние производства биогаза и его перспективы (P. Weiland и др., 2010), анаэробное сбраживание навоза КРС для производства биогаза (В.Н. Giploid и др., 2010), высокоэффективное разложение твёрдых органических отходов в мезофильных анаэробных условиях (Dong–Hoon Kim и др., 2011), значение ассоциации микроорганизмов при образовании биогаза из навоза свиней в анаэробных условиях с помощью контроля нейтрального показателя рН (Jun Zhou. И др., 2016), эффективность получения биогаза из навоза КРС (Lili Dong. и др., 2019), получение биогаза с использованием ассоциации микроорганизмов (Basma Omer. и др., 2019).

В стране ведется эффективная научно-исследовательская работа по получению биогаза из отходов сельского хозяйства, промышленных очистных сооружений, органических отходов, из биомассы некоторых галофитных растений, встречающихся в пустынных зонах. Например, Кукановой С.И., Ташпулатовым Ж.Ж. (2012-2014 гг.), Даврановым К.Д. (2015 г.), Аликуловым Б.С (2018 г.). Но в вышеуказанных исследовательских работах не проводились научные исследования по получению метаногенной ассоциации микроорганизмов и её использованию для устойчивого получения биогаза из отходов животноводческих хозяйств и птицеферм, эти исследования всё ещё остаются недостаточно изученными.

В связи с этим, в Республике особую необходимость приобретает разработка научно-обоснованной, экологически безопасной, безотходной технологии получения возобновляемого источника энергии (биогаза) с использованием местных штаммов микроорганизмов.

**Связь диссертационного исследования с планами научно-исследовательских работ высшего образовательного или научно-исследовательского учреждения, где выполнена диссертация.** Диссертационное исследование выполнено в соответствии с планом научно-исследовательских работ фундаментальных проектов Института микробиологии: ФА-ФЗ-Т130 «Изучение механизмов направленной

регуляции микробиологического образования альтернативных источников энергии (биогаз и биодизель)» (2008-2011гг.); ФА-А6-Т214 «Разработка технологии получения биотоплива на основе природных возобновляемых ресурсов» (2012-2014 гг.); ФА-А6-Т113 «Получение органического удобрения на основе птичьего помёта с применением метаногенной ферментации» (2015-2017гг.).

**Целью исследования** являлось получение активных сбалансированных метаногенных мезофильной (СМММ) и термофильной ассоциаций (СТММ) микроорганизмов для ускорения биогазовой ферментации. Разработка на их основе новых, более эффективных биотехнологий по переработке отходов животноводческих и птицеводческих хозяйств.

**Задачи исследования:**

получение активных мезофильных и термофильных ассоциаций микроорганизмов, изучение влияния полученных ассоциаций на выход биогаза с использованием отобранных субстратов;

оптимизация процесса получения биогаза из КРС, КП с использованием полученных мезофильной и термофильной метаногенных ассоциаций микроорганизмов;

определение основных групп микроорганизмов, участвующих в динамике биогазовой ферментации навоза КРС и КП;

определение таксономического положения некоторых метанобразующих бактерий, входящих в состав СТММ;

разработка метода обезвреживания отходов биогазовой ферментации в мезофильных условиях от патогенных бактерий;

получение ОУ на основе отработанного шлама (после биогазовой ферментации), изучение влияния ОУ на рост и развитие пшеницы в лабораторных условиях.

**Объектом исследования** являются сбалансированные мезофильная и термофильная ассоциации микроорганизмов (СМММ и СТММ), навоз крупного рогатого скота (КРС), куриный помёт (КП), табачная пыль (ТП), штамм *Lactobacillus plantarum* K04.84, ОУ и пшеница.

**Предметом исследования** является получение мезофильной и термофильной ассоциации микроорганизмов, образующих биогаз, определение основных физиологических групп микроорганизмов, участвующих в биогазовой ферментации, образование биогаза из навоза КРС, КП и ТП, изучение влияния ОУ на рост и развитие пшеницы в лабораторных условиях.

**Методы исследования** в процессе исследования использованы микробиологические, биохимические, молекулярно-генетические, биотехнологические методы.

**Научная новизна исследования:**

в процессе ступенчатой биогазовой ферментации навоза КРС получены сбалансированные мезофильная и термофильная метаногенные ассоциации микроорганизмов. Определено, что мезофильная и термофильная метаногенные ассоциации микроорганизмов образуют метан из навоза КРС 63,8%, и 69,7% из КП;

впервые проведён молекулярно-генетический анализ бактерий, входящих в состав сбалансированной в термофильных условиях метаногенной ассоциации микроорганизмов. В состав СТМММ входят бактерии, относящиеся к родам *Methanosarcina*, *Methanoculleus*, *Methanocorpusculum* и *Methanospirillum*, относящиеся к 9 видам;

впервые в процессе биогазовой ферментации использован штамм *Lactobacillus plantarum* K04.84 как антагонист к патогенной бактерии рода *Salmonella*, содержащейся в курином помёте;

установлено, что небольшие дозы органоминерального удобрения (в количестве 30% NPK+ 0,5 т/га ОУ) оказывают пролонгированное действие на рост и развитие пшеницы. Пролонгированное действие связано с тем, что содержание спорообразующих аммонифицирующих бактерий в ризосфере пшеницы в основном находятся в вегетативном состоянии. Количество клеток аммонифицирующих бактерий находящихся в споровом состоянии в опытном варианте составляло 2-3%, тогда как в контрольном варианте 37-40% соответственно.

**Практические результаты** исследования заключаются в следующем:

полученные в мезофильных и термофильных условиях ассоциации микроорганизмов будут использованы в получении биогаза из отходов сельского хозяйства.

**Достоверность полученных результатов.** Эксперименты проводились в 3-х повторностях, средняя оценка и стандартная погрешность (SE) рассчитаны программой Microsoft Excel (Корпорация Microsoft, США). Отклонения полученных результатов  $P \leq 0,05$  от контрольных показателей проанализировано программой ANOVA.

**Научная и практическая значимость результатов исследования.**

Научная значимость результатов исследований заключается в том, что полученные методом ступенчатого отбора СММММ и СТМММ при биогазовой ферментации навоза крупного рогатого скота дают возможность образования до 63,8% метана, и до 69,7% метана из куриного помёта. Разработан метод биотехнологического обеззараживания патогенных бактерий в составе куриного помёта отобраным штаммом *Lactobacillus plantarum* K04.84.

Полученные результаты внесут большой вклад в развитие научных исследований направленных на микробиологическую переработку сельскохозяйственных и органических отходов.

Практическая значимость результатов исследований заключается в том, что выделенные СММММ и СТМММ будут служить основой для использования в качестве исходного инокулята, повышающего

эффективность и ускоряющего биогазовую ферментацию органических отходов и навоза животноводческих и птицеводческих ферм нашей Республики.

**Внедрение результатов исследования.** На основе научных результатов по получению сбалансированных метаногенных ассоциаций микроорганизмов с помощью метода ступенчатого отбора:

полученная в процессе ступенчатой селекции СММАМ внедрена в фермерском хозяйстве «Улугбеклар» г.Туракуртан Наманганской области (справка Министерства сельского и водного хозяйства № 02/12-533 от 10 октября 2017 года). Сбраживание навоза КРС с применением сбалансированных ассоциаций, дало возможность получения 60-63% метана в газовом фоне.

Биотехнология получения биогаза из навоза КРС внедрена в фермерском хозяйстве «БАХТ» Паркенского района Ташкентской области (справка Министерства сельского и водного хозяйства № 02/12-533 от 10 октября 2017 года). В результате сбалансированная метаногенная ассоциация микроорганизмов ускорила процесс биогазовой ферментации, повысив в 3-4 раза количество метана в составе биогаза, по сравнению с контролем.

**Апробация результатов исследования.** Результаты исследований были обсуждены на 16-ти, в том числе, на 5 международных и 11 республиканских научно-практических конференциях.

**Опубликованность результатов.** По теме диссертации опубликовано 25 научных работ, из них 9 научных статей, в том числе 7 в республиканских и 2 в зарубежных журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Республики Узбекистан для публикации основных научных результатов диссертаций.

**Структура и объём диссертации.** Диссертация состоит из введения, пяти глав, заключения, списка использованной литературы и приложений. Объём диссертации составляет 113 страниц.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ**

**Во введении** обоснована актуальность диссертационной работы, изложены цель, задачи исследования, характеризуются объект и предмет исследования, показано соответствие исследования приоритетным направлениям развития науки и технологий республики, отмечено научное практическое значение работы, представлены данные о практическом внедрении результатов исследования, сведения о структуре диссертации.

В первой главе диссертации **«Микроорганизмы, участвующие в образовании биогаза, влияние физико-химических факторов на образование биогаза, получение биогаза и его состав, полученный в процессе метаногенеза из органических отходов, а также обзор литературных данных по хранению культур микроорганизмов»** представлен современный анализ литературных данных по сообществу микроорганизмов, участвующих в процессе биосинтеза метана; уделяется внимание изучению микробиологических основ процесса метаногенеза,

имеющего важное практическое значение, а также о физико-химических факторах, влияющих на образование биогаза; образование и состав биогаза в органических отходах. Показан биотехнологический потенциал использования органических отходов для биогазовой ферментации. Разработаны условия хранения культур микроорганизмов.

Во второй главе диссертации **«Методы оптимизации условий культивирования сбалансированных мезофильной и термофильной метаногенных ассоциаций»** описаны материалы и методы исследования: подбор оптимальных питательных сред и условия культивирования для микроорганизмов, содержащихся в СММAM и СТМAM. Показана динамика биогазовой ферментации при сбраживании навоза КРС, КП, и ТП с использованием СММAM, использованы методы определения белка, общего количества титруемых кислот, общее количество азота, глюкозы. Описаны методы определения  $\text{CH}_4$ ,  $\text{CO}_2$  и  $\text{N}_2$  в составе биогаза.

В третьей главе диссертации **«Получение сбалансированных мезофильной и термофильной ассоциаций метаногенных микроорганизмов»** приведены результаты исследований по получению СММAM и СТМAM в процессе ступенчатой биогазовой ферментации навоза КРС в мезофильных и термофильных условиях. Так, на первом этапе исследований при получении СММAM, 4 литра навоза КРС (с влажностью 90%) смешивали с 3 литрами рубцовой биомассы взятой из желудка КРС. Ферментацию проводили в анаэробном ферментёре объёмом 10 л при температуре 35°C. В процессе сбраживания навоза КРС на первом этапе общее количество образовавшегося биогаза составило 26  $\text{дм}^3$  с концентрацией метана 37% в газовом фоне.

На втором этапе к навозу КРС в объеме 7 л был добавлен инокулят в концентрации 20% полученный в процессе сбраживания на первом этапе ферментации; из всех продуктов первичного брожения основным считается ацетат, который является субстратом для роста и развития метанобразующих бактерий. С целью увеличения численности метанобразующих бактерий в сбраживающую систему добавлен ацетат натрия в концентрации 1 г/л. На втором этапе биогазовой ферментации наблюдается три пика интенсивного образования биогаза. Газообразующая способность увеличивается уже на 7; 13 и 18 сутки, с содержанием метана 42, 55,2 и 53% соответственно. При этом общий объём биогаза был в 2 раза больше по сравнению с первым этапом и составил 54  $\text{дм}^3$ .

При добавлении 20% инокулята со второго этапа в третий наблюдалось сокращение времени лаг-фазы. На 7, 14, 22 и 31 сутки ферментации выявлено 4 пика с содержанием метана 51,1; 55,2; 53 и 58% в газовом фоне соответственно. При этом общий объём биогаза был в 1,2 раза больше по сравнению со вторым этапом и составил 65,7  $\text{дм}^3$ .

Как известно, в сбраживающей системе большое значение имеет рН навоза КРС. Для того чтобы выяснить, в какой степени полученная на третьем этапе СММАМ способна сбраживать навоз КРС в щелочных условиях (рН=8.5), проведён вариант опыта с использованием 20% инокулята и значения рН=8,5. Показано, что газообразующая способность с использованием СММАМ при сбраживании навоза КРС с исходным значением рН=8,5 начиналось без лаг-фазы. На 6 сутки ферментации наблюдается снижение рН до 7,0 и до конца процесса ферментации этот показатель был в пределах рН-7,2–7,6 т.е. в сбалансированном состоянии. Количество метана в составе биогаза постепенно увеличивалось и на 12 и 18 сутки ферментации достигло самого высокого пика с содержанием биогаза 60,7 и 63,8% соответственно (рис. 1).

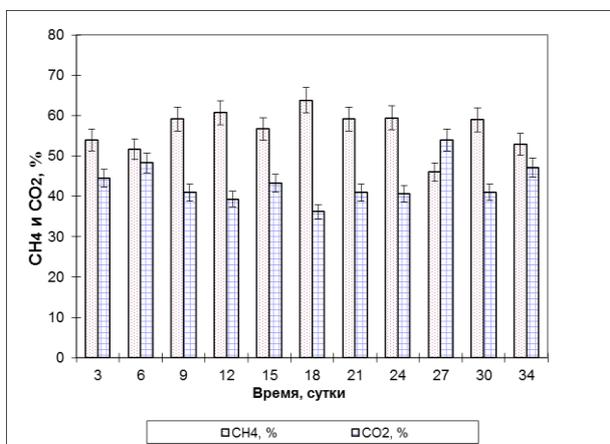


Рис 1. Динамика образования CH<sub>4</sub> и CO<sub>2</sub> в процессе ферментации с использованием 20% инокулята СММАМ.

При анализе данных образования углекислого газа на четвертом этапе, установлено, что на 6, 15, 27 и 34 сутки ферментации отмечаются 4 пика с концентрацией CO<sub>2</sub>, равные 48,2, 43,3, 54 и 47,1%. Исследования показали, что снижение содержания CO<sub>2</sub> в сбраживающей системе сопровождается повышением содержания метана в течение всего процесса брожения. Более того, к 18 суткам ферментации наблюдается максимальное содержание метана, свидетельствующее, что в процессе сбраживания одним из предшественников образования метана является CO<sub>2</sub>.

Таким образом, в результате исследований определено, что в контрольном варианте опыта при сбраживании навоза КРС максимальное содержание CH<sub>4</sub> в газовом фоне не превышало 37,7%. Тогда как в опытном варианте с использованием 20% инокулята СММАМ, в отличие от контрольного варианта, концентрация CH<sub>4</sub> была в 1,7 и 1,8 раза выше и составило (60,7 и 63,8%).

Образование биогаза и высокое количество метана в составе биогаза полученного на 4 этапе показало, что на третьем этапе образуется активная СММАМ. В последующих экспериментах для получения биогаза из различных субстратов использовался инокулят СММАМ, полученный на третьем этапе ферментации.

Так как метанообразующие бактерии растут медленнее, чем бродильные микроорганизмы, образованию газа предшествует накопление летучих жирных кислот. В связи с этим, в динамике сбраживания КРС были определены общее количество титруемых органических кислот, ацетата и рН. Установлено, что в динамике сбраживания на 6, 12 и 21 сутки концентрация

ацетата составила 3,32, 4,94 и 7,98 мг/мл. Показано, что более низкое содержание ацетата в сбраживающей системе коррелирует с высоким содержанием метана (63,8%).

Показано, что при ферментации навоза КРС при исходном значении pH 8,5 на 6 сутки наблюдается снижение pH до 7,0 и до конца процесса ферментации этот показатель был в пределах pH=7,2 – 7,6 т.е. в сбалансированном состоянии. Во время ферментации навоза в течение 6 дней наблюдалось высокое содержание общих органических кислот 18,8 мг/мл. С этого периода наблюдается увеличение образования метана и достигает своего максимума на 18 сутки ферментации с концентрацией метана 63,8%. В последующие дни ферментации общее количество органических кислот существенно не изменялось. В процессе сбраживания навоза КРС с использованием СММАМ биосинтез органических кислот и их использование в органической системе выровнялось, а образование биогаза увеличивается.

В динамике биогазовой ферментации навоза КРС в мезофильных условиях определено общее количество спорообразующих целлюлозаразлагающих, метанобразующих бактерий, анаэробных аммонификаторов, а также бактерии семейства *Enterobacteriaceae Escherichia coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, рода *Pseudomonas*. Высокое количество целлюлозаразлагающих бактерий наблюдалось на 21 сутки брожения и составило  $0,75 \times 10^6$  кл/мл. Количество метанобразующих бактерий на 15 и 21 сутки составило  $7,5 \times 10^3$  кл/мл, что соответствовало высоким показателям образования метана. Установлено, что после 18 суток ферментации наблюдается снижение численности анаэробных аммонифицирующих бактерий в сбраживающей системе. Обнаружено, что через 21 суток ферментации наблюдается снижение общего количества бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, соответственно к этому периоду снижается титр клеток бактерий рода *Salmonella*.

Для того, чтобы использовать органический субстрат полученный в процессе ферментации навоза КРС, в качестве ОУ без содержания в нём патогенной микрофлоры необходимо проводить ферментацию в течение 20-21 день.

Известно, что в процессе биогазовой ферментации навоза КРС и КП в мезофильных условиях фермерские хозяйства в целях устойчивого получения биогаза каждые 2-3 сутки добавляют 10-15% суспензии навоза КРС и КП, извлекая из реактора такое же количество органического субстрата, которое в последующем используется в качестве ОУ. Но такое удобрение загрязнено бактериями рода *Salmonella*, что вызывает

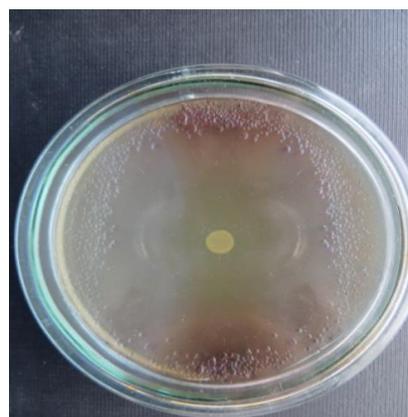


Рис.2. Антагонистическая активность штамма *L.plantarum K04.84* на рост и развитие бактерии

вторичную контаминацию окружающей среды и почвы. По этой причине для снижения титра бактерий рода *Salmonella* в составе органического субстрата проведён скрининг штаммов бактерий *Lactobacillus plantarum*, выделенных в лаборатории “Микробиология и биотехнология пробиотиков” Института микробиологии АН РУз. В результате скрининга отобран штамм *L.plantarum K04.84* обладающий антагонической активностью по отношению к бактерии рода *Salmonella sp.* Определено, что штамм *L.plantarum K04.84.* подавляет рост бактерий рода *Salmonella sp.*, диаметр зоны подавления роста 30 мм (рис.2).

Для определения антагонистической активности штамма *L.plantarum K04.84* был использован органический субстрат, полученный в процессе сбраживания КП в мезофильных условиях. К органическому субстрату в различных соотношениях добавлена суспензия клеток штамма *L.plantarum K04.84* (табл. 1).

Таблица 1

Влияние *L.plantarum K04.84* на подавление роста бактерии рода *Salmonella* в процессе биогазовой ферментации.

Соотношение штамма <i>L. plantarum K04.84</i> ( $1 \times 10^9$ КОЕ/мл) к КП	Количество клеток бактерии <i>Salmonella sp.</i> , КОЕ/мл			Титр клеток штамма <i>L. plantarum K04.84</i> , КОЕ/мл (через 3 суток)
	Исходный	Через сутки	Через 3 суток	
1 мл / 200 мл (1:200)	$6,0 \times 10^6$	$5,0 \times 10^6$	$3,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^3$
2 мл / 200 мл (1:100)	$6,0 \times 10^6$	$4,0 \times 10^3$	$2,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^4$
3 мл / 200 мл (1:66)	$6,0 \times 10^6$	$5,0 \times 10^3$	0	$1,0 \times 10^6$
5 мл / 200 мл (1:40)	$6,0 \times 10^6$	$4,0 \times 10^3$	0	
10 мл / 200 мл (1:20)	$6,0 \times 10^6$	$4,0 \times 10^2$	0	
15 мл / 200 мл (1:13)	$6,0 \times 10^6$	$3,0 \times 10^2$	0	

Показано, что при соотношении суспензии клеток штамма *L.plantarum K04.84* к органическому субстрату в количестве 1/100 в процессе ферментации в течении суток при исходном количестве клеток бактерий рода *Salmonella sp*  $6,0 \times 10^6$  титр клеток снизился и составил  $4,0 \times 10^3$  КОЕ/мл КОЕ/мл. На 3 сутки ферментации этот титр клеток уже составил  $2,0 \times 10^2$  КОЕ/мл. В вариантах опытов где суспензия клеток штамма *L.plantarum K04.84* была использована в соотношениях 1:66, 1:40, 1:20 и 1:13 на 3 сутки биогазовой ферментации наблюдалось полное уничтожение бактерий рода *Salmonella sp.* В результате проведённых исследований разработана биотехнология обеззараживания органического отхода от бактерий рода *Salmonella sp.*

По литературным данным известно, что с экологической и экономической точки зрения самым эффективным методом является получение биогаза в термофильных условиях. В термофильных условиях с

использованием активной микрофлоры время ферментации сокращается до 5-7 суток. Это снижает затраты на объём биогазовой установки в 5-6 раз, и затраты на строительные материалы. Кроме этого, учитывая климатические условия нашего региона, когда температура воздуха с мая по сентябрь благоприятна для проведения биогазовой ферментации в термофильных условиях, последующие исследования проводили в термофильных (55°C) условиях.

Изучение динамики процесса метаногенеза КП в термофильных условиях показало, что метанообразование, как с внесением сбалансированной СТММ, так без внесения СТММ, начиналось с первых суток ферментации. Однако, в опытном варианте содержание метана в газовом фоне в течение 24 часов ферментации был 2,9 раза больше, по сравнению с контролем. Без внесения инокулята максимальное образование метана наблюдалось на 29 сутки и составило 54,8%.

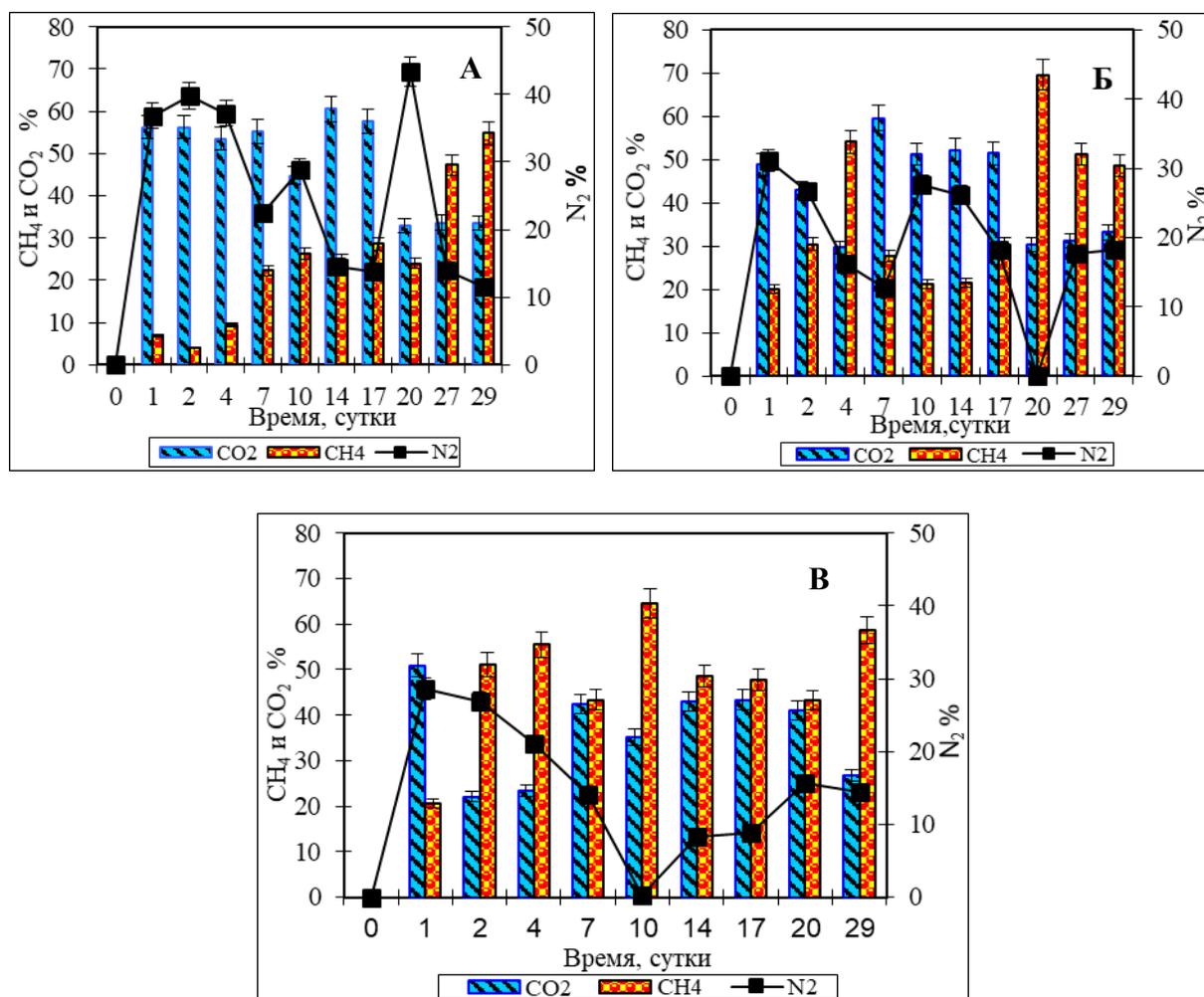


Рис. 3. Динамика образования CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub> и N<sub>2</sub> в процессе биогазовой ферментации КП в термофильных условиях: А – естественная микрофлора КП (контроль), Б – добавление 10% инокулята СМММ в КП (опыт) и В – добавление 20% инокулята СМММ в КП (опыт).

В то время как с внесением 10 и 20% инокулята СТМАМ на 4 сутки содержание метана составило 54,1 и 55,5%, на 20 и 10 сутки 69,7 и 64,7% метана, соответственно (рис.3).

Установлено, что внесение в КП СТМАМ в концентрациях 10 и 20% способствовало увеличению содержания метана в газовом фоне. С добавлением в КП 20%-го инокулята выявлено 3 пика интенсивного образования метана, которые наблюдаются на 4, 10 и 29 сутки ферментации с содержанием метана 55,5, 64,7 и 58,7%, соответственно.

Обнаружено, что в начальной стадии ферментации как в контрольном, так и в опытных вариантах эксперимента наблюдается высокое содержание  $\text{CO}_2$  и  $\text{N}_2$ . Также обращает на себя внимание тот факт, что в процессе сбраживания КП как в контрольном, так и в опытных вариантах опыта стадия более интенсивного образования общего количества газа не соответствует стадии максимального образования метана. В процессе сбраживания КП в термофильных условиях выявлена корреляция между снижением содержания  $\text{CO}_2$  и образованием  $\text{CH}_4$ . Это свидетельствует о том, что в процессе сбраживания КП как в мезофильных, так и в термофильных условиях одним из возможных предшественников образования метана является  $\text{CO}_2$ .

Как известно, в птичьей помете содержатся различные патогенные бактерии, яйца гельминтов, семена сорных растений, которые негативно воздействуют на окружающую среду. Результаты исследования показали, что в свежем КП доминировали бактерии, относящиеся к семейству *Enterobacteriaceae*, и в том числе *Escherichia coli*, их количество составило  $6,0 \times 10^7$  кл/мл и  $4,6 \times 10^6$  КОЕ/мл соответственно. Численность бактерий рода *Shigella* и рода *Salmonella* не превысила  $1,8 \times 10^5$  КОЕ/мл и  $5,0 \times 10^4$  КОЕ/мл, соответственно.

В КП до ферментации количество *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus* составило  $2,0 \times 10^4$  КОЕ/мл и  $2,0 \times 10^3$  КОЕ/мл, соответственно. Установлено, что с добавлением в КП 10 и 20% инокулята СТМАМ в процессе сбраживания численность метанобразующих бактерий, в отличие от контрольного варианта, увеличилась в 20 раз, и составило  $5,0 \times 10^4$  кл/мл. Численность целлюлозаразлагающих и анаэробных азотфиксирующих бактерий по сравнению с контрольным вариантом (без внесения инокулята) было на 2-1,9 порядка выше и составило  $5,0 \times 10^6$  кл/мл и  $2,5 \times 10^4$  кл/мл, соответственно. В процессе сбраживания КП в термофильных условиях при  $55^\circ\text{C}$ , не было обнаружено патогенных бактерий, относящихся к семейству *Enterobacteriaceae* включая вид *Escherichia coli*, роды *Shigella* и *Salmonella*. Значит, ОУ на основе КП полученного в термофильных условиях полностью отвечает требованиям микробиологической части ГОСТ при использовании для сельскохозяйственных растений.

Для определения таксономии метанобразующих бактерий в составе СТМАМ выделены общие ДНК бактерий и проведена амплификация 16S rRNA гена методом ПЦР на основе праймеров Arch F2, Arch R1386, специальных праймеров ME1, ME2 и MLf, MLr которые амплифицируют

ген фермента Метил-коэнзим М-редуктаза (MCR). Полученные ПЦР продукты клонированы в ТОРО-ТА вектор и в результате выделено 15 клонов компетентных клеток *E. coli*, содержащих ПЦР продукт. Далее проведено секвенирование выделенных клонов со специфичными праймерами и полученные секвенс последовательности сравнивались с базой данных Blast-гомологии. В результате выявлены виды бактерий с высокой степенью гомологии. На основе полученных результатов составлено филогенетическое дерево с помощью программы Fig Tree (рис.4).

Согласно результатам исследования метанобразующие бактерии, растущие в термофильных условиях, на 99-100% соответствуют 9 видам *Methanosarcina thermophilus*, *Methanosarcina thermophila*, *Methanosarcina kolksee*, *Methanoculleus bourgensis*, *Methanosarcina horonobensis*, *Methanosprillum hungatei*, *Methanosarcina barkeri*, *Methanosarcina flavescens*, *Methanocorpusculum parvum*. Данные исследования проводились совместно с Институтом геномики и биоинформатики АН РУз.

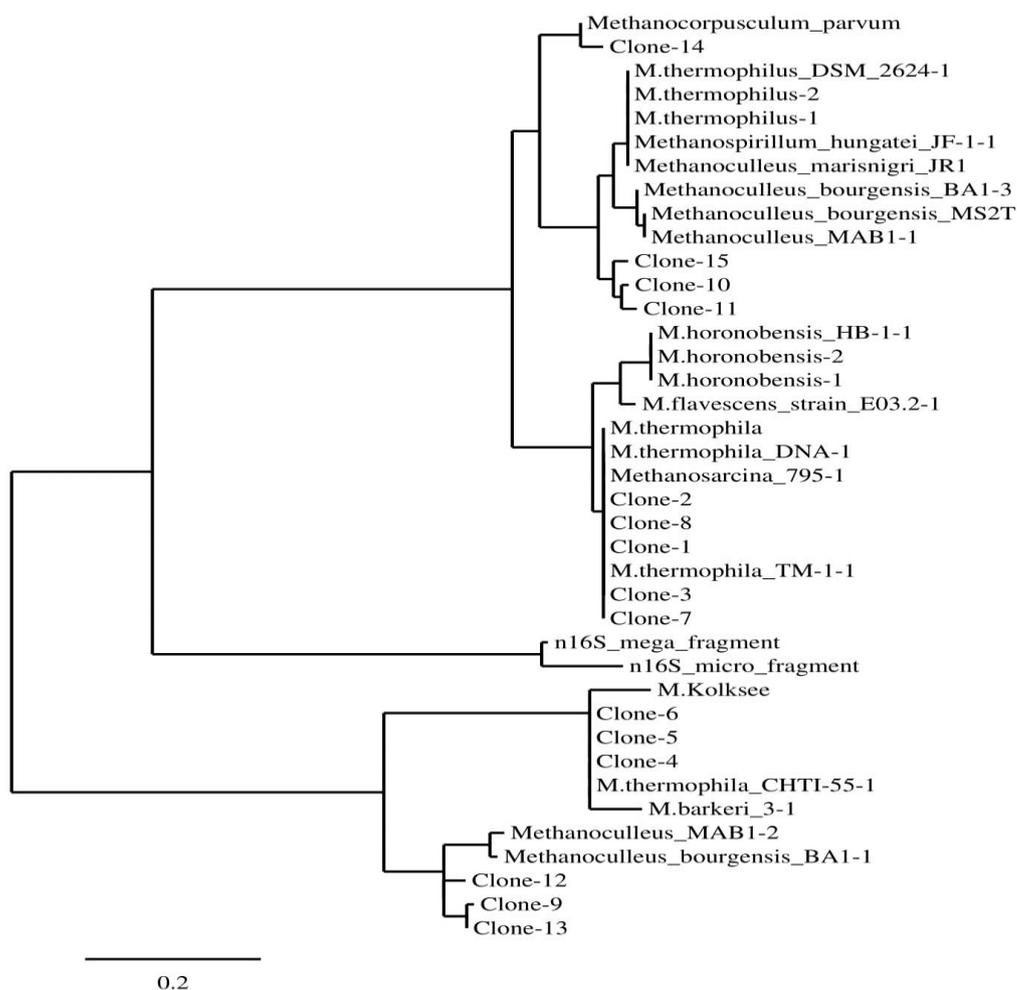


Рис.4. Филогенетическое дерево метанобразующих бактерий

В четвертой главе диссертации «Исследование и разработка методов хранения СММАМ» представлены результаты по разработке метода хранения различных физиологических групп микроорганизмов, входящих в состав ассоциации. Для сохранения высокой метанообразующей способности

СММАМ в лиофильных условиях подобрана защитная среда с содержанием фосфоритной муки 0,5 г и 10% желатина+сахароза.

Пятая глава диссертации «Изучение влияния органического удобрения, полученного в процессе биогазовой ферментации, на рост и развитие пшеницы и разработка биотехнологии получения биогаза с использованием СММАМ и СТМАМ» посвящена применению полученного ОУ при культивировании пшеницы в лабораторных условиях в течение 40 дней, а также разработка принципиальной схемы по применению СММАМ и СТМАМ для сбраживания органических отходов. Как известно, основным способом поддержания почвенного плодородия, улучшения качества почв и увеличения урожайности сельскохозяйственных культур было и остается внесение органических удобрений. За счет ОУ реутилизируются, т.е. повторно используются, большая часть питательных веществ, поступающих в растения из почвы. Улучшаются физико-химические и биологические свойства почв, повышается содержание гумуса.

Лабораторные исследования показали, что внесение ОУ в низких концентрациях (0,2 и 0,5 т/га ОУ + NPK 30%) оказывает стимулирующее действие на рост и развитие корневой системы пшеницы (рис. 5). Обнаружено, что при использовании навоза КРС (контроль) в концентрации 20 т/га стебли пшеницы и длина корней были ниже, чем в вариантах с использованием ОУ в концентрациях: NPK 30%+ ОУ 0,2 т/га и NPK 30% + ОУ 0,5 т/га. Поскольку микробиоценоз почвы является важным фактором развития корневой системы растений, было изучено влияние ОУ на численность различных групп микроорганизмов. Исследования показали, что внесение в почву ОУ 0,2 т/га и 0,5 т/га способствовало увеличению численности аммонифицирующих бактерий. Установлено, что в контрольном варианте в течение 40 дней вегетации количество спорных форм аммонифицирующих бактерий в ризосферной зоне пшеницы достигало 37-40%.

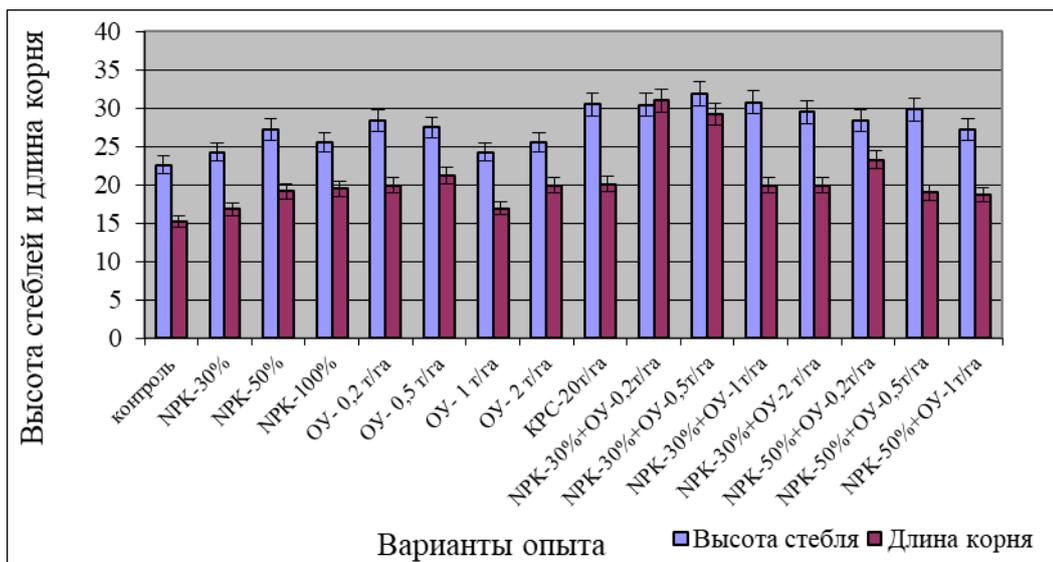


Рис.5. Влияние органоминерального удобрения на рост и развитие стебля и корней пшеницы

Показано, что внесение в почву небольших доз ОУ оказывает стимулирующее действие на рост и развитие пшеницы, основная масса аммонифицирующих бактерий в ризосфере пшеницы находится в вегетативном состоянии и не более 2-3% в споровом состоянии. Тогда как, в контрольном варианте без удобрения, титр клеток аммонифицирующих бактерий, находящихся в споровом состоянии составило 37-40%.

Экспериментально установлено, что в ОУ после термофильного сбраживания КП с добавлением 10% и 20% инокулята СТМММ по сравнению с контрольным вариантом опыта содержание гуминовых кислот в 1,3 и 1,6 раза больше, и варьировало от 18,9 до 23,6%; ауксина в 1,3 и 1,4 раза больше и варьировало от 105 до 115 мкг/г.; гиббереллина в 1,2-1,5 раза больше и составило 350-430 мкг/г. Обнаружено, что содержание фульвокислот в ОУ незначительно отличалось от контрольного варианта и составило 24,1% и 24,5% от общего количества органоминеральных веществ содержащихся в золе.

На основе проведённых лабораторных и прикладных исследований по биогазовой ферментации навоза КРС и КП разработана принципиальная технологическая схема получения биогаза (рис.6) и испытана на биогазовой установке объёмом 13 м<sup>3</sup> в фермерском хозяйстве “Бахт” Паркентского района Ташкентской области.

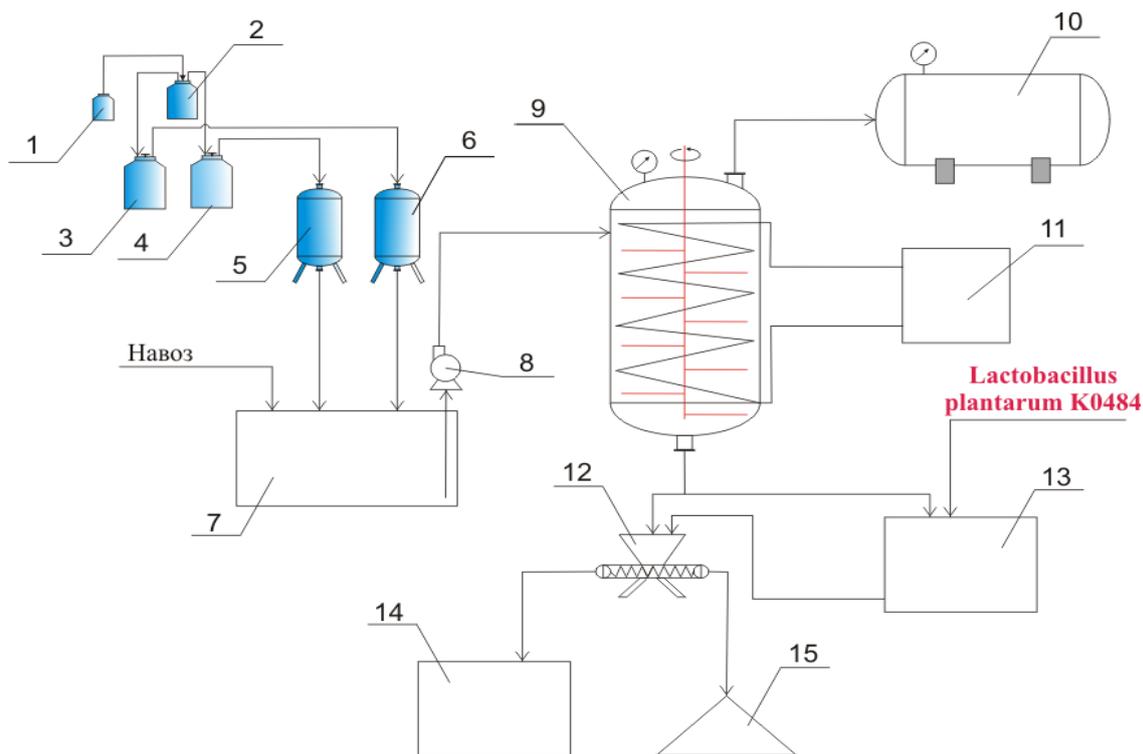


Рис.6. **Принципиальная технологическая схема получения биогаза** 1 – Лиофильно высушенный препарат СММММ (5 гр); 2 – культивирование СММММ в 2,5 литровом анаэроостате; 3- 4 – культивирование СММММ в 10 литровом анаэроостате; 5-6 – биогазовая ферментация СММММ в анаэроостате объёмом 75 л; 7 – пруд для подготовки навозной жижи для биогазовой ферментации; 8 – насос для подачи готовой навозной жижи в биореактор; 9 – биогазовая установка (13 м<sup>3</sup>); 10 – газгольдер; 11- установка обогрева биореактора; 12 – сепаратор; 13 – ёмкость для обеззараживания навоза от патогенных бактерий штаммом *L. plantarum K04.84*; 14 – пруд для сбора жидкого удобрения; 15 – место сбора твёрдой фракции удобрения.

Для проведения биогазовой ферментации в биореакторе вносили в питательную среду 5 г лиофильно высушенной СММММ. Питательная среда получена на основе КП. Культивировали в анаэроостате объёмами 2,5, 10, 75 л в течение 14 суток при температуре 35°C (рис. 6; 2-6). Полученную СММММ в концентрации 10% от общего объема субстрата в биореакторе использовали в качестве инокулята для ускорения образования метана в биореакторе. СММММ загружали с помощью насоса на дно биореактора, в котором предварительно за сутки до ферментации с использованием насоса был загружен субстрат КП с влажностью 90%, что обеспечило стабильное образование биогаза (рис. 6; 7-9). В мезофильных условиях время ферментации в биореакторе может составлять 30 дней, но для ускорения биогазовой ферментации и непрерывного производства биогаза каждые 2–3 сутки добавляли 10% инокулята, полученного в процессе предварительного сбраживания, с выгрузкой из биореактора такого же количество органического отхода. Полученный биогаз собирали в газгольдере и анализировали его состав (рис. 6; 10). Получаемый биогаз состоит из 60% CH<sub>4</sub>, 38% CO<sub>2</sub> и 2% других газов, было обнаружено, что количество CH<sub>4</sub> варьирует от 55 до 65%. Температура в биореакторе поддерживалась с помощью нагревательного устройства (рис. 6; 11). Органический отход полученный после сбраживания в биореакторе для нейтрализации патогенной микрофлоры (*Salmonella*), обрабатывался в сборниках штаммом *L. plantarum K04.84*. В биореактор объёмом 13 м<sup>3</sup> каждые 2-3 суток вносится субстрат в объёме 1 м<sup>3</sup> с выводом такого же объёма шлама. В шлам добавляется суспензия в количестве 10<sup>9</sup> КОЕ/мл штамма *L. plantarum K04.84* в расчёте 15 литров и в течение 3 суток при температуре 37°C проводится ко-ферментация, т.е таким образом проводится обеззараживание шлама от бактерий рода *Salmonella* (рис.6; 13). Обеззараженное ОУ в сепараторе разделяется на жидкую и твёрдые фракции (рис.6; 12, 14 и 15).

Таблица 2

Экономическая эффективность получения биогаза в биореакторе с 13м<sup>3</sup>

Перемешивание и загрузка субстрата, квт/час, сум		Рабочая сила, сум	Биогаз, м <sup>3</sup>	Биогаз, сум	Общие затраты, сум	Чистая прибыль, сум	
день	3,0 квт/ч	295*7080,00	36,666	380*150	57000,00	43746,00	13265,00
месяц	720 квт/ч	212400,00	1,100,000	4500	1710000,00	1312400,00	397960,00
год	8640к вт/ч	2544800,00	13,200000	1620000	20520000,00	1574448,00	4755200,00

При проведении биогазовой ферментации в термофильных условиях при температуре 55°C по данной биотехнологической схеме патогенная микрофлора, яйца гельминтов и семена сорняков уничтожались в процессе ферментации. Таким образом, в результате проведённых исследований разработана экологически эффективная биотехнология для биогазовой ферментации навоза КРС и КП.

Экономическая эффективность полученной технологии представлена в таблице 2. Рассчитаны расходы на электроэнергию при внесении субстрата в

биогазовую установку, расход энергии в процессе перемешивания в биореакторе, а также месячная зарплата одного рабочего. Будет произведено 12 тонн сухого и 110 тонн жидкого ОУ. Установлено, что использование полученной СМММ и СТММ увеличивает эффективность процесса получения биогаза в биогазовых установках.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основе проведенных исследований по диссертации на тему “Получение биогаза на основе активной метанобразующей ассоциации микроорганизмов” представлены следующие выводы:

1. В результате ступенчатой селекции при сбраживании навоза КРС в мезофильных и термофильных условиях получены активные сбалансированные метаногенные ассоциации микроорганизмов. При биогазовой ферментации навоза КРС с добавлением инокулята СМММ получен наиболее высокий выход биогаза с содержанием метана 63,8% в газовом фоне.
2. Установлено, что метанобразующая способность природной ассоциации КП в термофильных условиях (55°C) с добавлением СТММ наблюдалось сокращение времени лаг фазы, содержание метана варьировало от 64 до 69,7%. Выявлена корреляция между содержанием CO<sub>2</sub> и количеством метана в сбраживающей системе.
3. Выявлено, что при ферментации в мезофильных условиях более 20 суток титр клеток кишечной палочки и бактерий рода салмонелла снижается, а при биогазовой ферментации в термофильных условиях (55°C) на вторые сутки ферментации полностью уничтожаются бактерии *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* и представители родов *Salmonella* и *Shigella* семейства *Enterobacteriaceae*.
4. Молекулярно-генетический анализ таксономического положения метанобразующих бактерий в составе местного СТММ показал, что они состоят из 9 видов, относящихся к родам *Methanosarcina*, *Methanoculleus*, *Methanosprillum*, *Methanocorpusculum*.
5. Выявлена антагонистическая активность штамма *L. plantarum* K04.84 к бактерии рода *Salmonella sp.* Установлено, что при соотношении штамма *L. plantarum* K04.84 к бактерии рода *Salmonella sp.* (1:66) в мезофильных условиях наблюдается подавление роста бактерий рода *Salmonella sp.*
6. Для сохранения высокой метанобразующей способности СМММ в условиях лиофильного высушивания подобрана защитная среда с содержанием фосфоритной муки 0,5 гр и 10% желатина+сахароза.
7. Установлено, что небольшие дозы органоминерального удобрения (в количестве 30% НРК+ 0,5 т/га ОУ) оказывают пролонгированное действие на рост и развитие пшеницы. Пролонгированное действие органо-минерального удобрения на рост и развитие пшеницы связано с тем, что основная часть спорообразующих аммонифицирующих бактерий в ризосфере пшеницы находится в вегетативном состоянии и не более 2-3% в споровом состоянии. Тогда как, в контрольном варианте без удобрения, титр клеток аммонифицирующих бактерий, находящихся в споровом состоянии составило 37-40%.

**SCIENTIFIC COUNCIL ON AWARDING SCIENTIFIC DEGREES  
DSC.02/30.12.2019.B.38.01 AT THE INSTITUTE OF MICROBIOLOGY**  

---

**INSTITUTE OF MICROBIOLOGY**

**TASHBAEV SHERZODBEK ABDURASULOVICH**

**OBTAINING OF BIOGAS BASED ON THE ACTIVE METHANO-  
FORMING ASSOCIATION OF MICROORGANISMS**

**03.00.12 –BIOTECHNOLOGY**

**DISSERTATION'S ABSTRACT**  
**of the Doctor of Philosophy (PhD)of biological sciences**

## **Tashkent – 2020**

**Subject of this dissertation for a degree of Doctor of Philosophy (PhD) has been registered under no. B2017.1.PhD/B42 by the Supreme Attestation Commission under the Cabinet of Ministers of the Republic of Uzbekistan.**

The doctoral dissertation has been conducted at the Institute of Microbiology.

The abstract of the dissertation is posted in three (Uzbek, Russian, English (abstract)) languages on the website of the Scientific Council (microbio@academy.uz) and on the website «Ziyonet» information and educational portal (www.ziyonet.uz).

**Scientific supervisor:** **Alimova Barno Khasanovna**  
Doctor of Philosophy (PhD) in biology, Senior researcher

**Official opponents:** **Khujamshukurov Nortoji Abdukhalikovich**  
Doctor of sciences in biology, Professor

**Rasulov Bakhtiyor Abdugafurovich**  
Doctor of sciences in biology

**Leading organization:** **Samarkhand State University**

The defense of the dissertation will take place on «25» February 2020 at 10<sup>00</sup> the meeting of the Scientific Council DSc.02/30.12.2019.B.38.01 of the Institute of Microbiology (Address: 100128, Tashkent, 7<sup>B</sup> A.Kadyri str., conference hall of the Institute of Microbiology. Phone: (+99871) 241-92-28, (+99871) 241-71-98, Fax: (+99871) 241-92-71).

The dissertation has been registered at the Information Resource Centre at the Institute of Microbiology under № \_\_\_\_ (Address: 100128, Tashkent, 7<sup>B</sup> A.Kadyri str. Phone: (+99871) 241-92-28, (+99871) 241-71-98, Fax: (+99871) 241-92-71), e-mail: microbio@academy.uz).

The abstract of the dissertation is distributed on «\_\_» \_\_\_\_\_ 2020.  
(protocol at the register № \_\_\_\_\_ dated by «\_\_» \_\_\_\_\_ 2020).

**Aripov Takhir Fatikhovich**  
Chairman of the scientific council awarding scientific degrees, Dr.Sc.B., Professor, Academician

**Juraeva Roxila Nazarovna**  
Scientific secretary of the scientific council awarding scientific degrees, PhD, Senior researcher

**Gulyamova Tashkhan Gafurova**  
Chairman of the scientific seminar under the scientific council awarding scientific degrees, Dr.Sc.B., Professor

## INTRODUCTION (abstract of PhD thesis)

**The aim of the research work** is studying and obtaining of an active balanced methanogenic mesophilic (BMMAM) and thermophilic (BMTAM) associations of microorganisms, accelerating biogas fermentation and development of new more effective biotechnologies on their bases for processing of livestock and poultry farms' wastes.

**The objects of the research work** are balanced methanogenic mesophilic and thermophilic associations of microorganisms (BMMAM and BMTAM), cattle manure (CM), poultry dung (PD), tobacco dust (TD), *Lactobacillus plantarum* K04.84 strain, organic fertilizer (OF) and wheat.

**Scientific novelty of the research** is as follows:

By stepwise biogas fermentation process of CM the balanced mesophilic and thermophilic methanogenic associations of microorganisms have been obtained. It was determined that mesophilic and thermophilic methanogenic associations of microorganisms produce 63.8% and 69.7% of methane from CM and PD, respectively;

For the first time, molecular genetic analysis of the bacteria that are part of the balanced methanogenic association of microorganisms was performed. The BMTAM composition includes bacteria belonging to the genera of *Methanosarcina*, *Methanoculleus*, *Methanocorpusculum* and *Methanospirillum*, which belong to 9 species;

For the first time, the antagonistic activity of the *Lactobacillus plantarum* K04.84 strain to the pathogenic Salmonella bacterium contained in PD was studied during biogas fermentation process;

It was found that small doses of organomineral fertilizer (in 30% of NPK + 0.5 t/ha of OF) have a prolonged effect on the growth and development of the wheat. In experimental trial, the number of vegetative cells of spore-forming ammonifying bacteria in the wheat rhizosphere is in the vegetative state and 2-3% of which are spores, while in the control variant the titer of ammonifying bacteria cells in the spore form was 37-40%.

**Implementation of research results.** The practical results of the study are as follows:

Obtained BMMAM by stepwise selection process was applied at the Ulugbeklar farm of the Turakurgan city of the Namangan region (certificate of the Ministry of Agriculture and Water Resources No. 02/12-533 of October 10, 2017). In result of CM fermentation, it was possible to form 60-63% of methane;

The technology for producing of biogas from CM was applied in the "BAHT" farm, Parken district of Tashkent region (certificate of the Ministry of Agriculture and Water Resources No. 02/12-533 of October 10, 2017). In result, the balanced methanogenic association of microorganisms drastically accelerated the biogas fermentation process and made it possible to increase the amount of methane in biogas by 3-4 times compared to the control.

**The structure and volume of the dissertation.** The dissertation consists of the introduction, five chapters, bibliography and appendixes. The volume of the dissertation is 113 pages.

**ЭЪЛОН ҚИЛИНГАН ИШЛАР РЎЙЎАТИ**  
**СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ**  
**LIST OF PUBLISHED WORKS**

**I бўлим (I часть; I part)**

1. Арипов Т.Ф., Пулатова О.М., Алимова Б.Х., Ташбаев Ш.А., Махсумханов А.А. Получения биогаза с использованием ассоциации метанообразующих бактерий // Узбекский биологический журнал, 2011.-№ 1 С. 21-24. (03.00.00, № 5).
2. Алимова Б.Х., Пулатова О.М., Ташбаев Ш.А., Камбаралиева М.И., Махсумханов А.А., Арипов Т.Ф. Использование сбалансированной метаногенной ассоциации для сбраживания куриного помёта домашнего хозяйства // Узбекский биологический журнал, 2012.-№ 5. С.15-17. (03.00.00, № 5).
3. Алимова Б.Х., Ташбаев Ш.А., Пулатова О.М., Арипов.Т.Ф. Изучение условий хранения ассоциации микроорганизмов, участвующих в процессе метаногенеза // Узбекский биологический журнал, 2012. Спец выпуск. С. 8-10 (03.00.00, № 5).
4. Алимова Б.Х., Ташбаев Ш.А., Пулатова О.М., Махсумханов А.А., Хамидова Х.М. Получения биогаза из отходов табачного производства с использованием ассоциации метанообразующих бактерий // Узбекский биологический журнал, 2013.-№ 6. С. 20-23. (03.00.00, № 5).
5. Ташбаев Ш.А., Пулатова О.М., Алимова Б.Х., Махсумханов А.А., Арипов.Т.Ф. Влияние условий хранения на выживаемость метаногенной ассоциации микроорганизмов // Вестник НУУз, 2015. - № 3/2. С. 120-123. (03.00.00, № 9).
6. Ташбаев Ш.А., Пулатова О.М., Алимова Б.Х., Махсумханов А.А. Изучение выживаемости и метанообразования сбалансированной метаногенной ассоциации микроорганизмов // Вестник НУУз, 2016. - № 3/2. С. 127-132. (03.00.00. № 9).
7. Ташбаев Ш.А., Пулатова О.М., Алимова Б.Х., Махсумханов А.А., Сравнительное изучение влияния минерального, органического и органоминерального удобрений на рост и развитие пшеницы в лабораторных условиях // Вестник аграрной науки Узбекистана, 2017.- №3,(69). С.83-88. (03.00.00, №
8. Sh.A.Tashbaev., O.M.Pulatova., B.Kh.Alimova., A.A.Makhsumkhanov. Utilization of thermophylic methanogenic microorganisms association for poultry dung fermentation // International science journal “ The way of sciene ”, 2017.- No.8. P.19-25.(Global, IF=0,543).
9. Sh.A.Tashbaev., A.A.Makhsumkhanov., B.Kh.Alimova.,O.M.Pulatova. Effect of methanogenesis-based organic fertilizer on the wheat rhizospheric microscopic flora // European science review. Austria .Vienna, - 2018. - № 11-12. P. 38-40. (Global, IF=1,36).

## II бўлим (2 часть; II part)

10. Пулатова О.М., Алимова Б.Х., Ташбаев Ш.А., Нормуродова К.Т., Махсумханов А.А., Арипов Т.Ф. Изучение некоторых параметров метанобразования // Актуальные проблемы химии природных соединений: Сборник тезисов. 12-13 октября -Ташкент. 2010.С.152.
11. Алимова Б.Х., Махсумханов А.А., Пулатова О.М., Ташбаев Ш.А., Арипов Т.Ф. Изучение процесса метанобразования с использованием ассоциации метанобразующих бактерий // Биотехнология: состояние и перспективы развития: Московского международного конгресса.-Москва (Россия), 2011.С.75-76.
12. Ташбаев Ш.А., Пулатова О.М., Алимова Б.Х., Махсумханов А.А., Арипов.Т.Ф. Получение метана из органических отходов с использованием метаногенной ассоциации // Актуальные проблемы химии природных соединений: Сборник тезисов.Конференция молодых учёных. -19-март Ташкент, 2012. С. 107.
- 13.Ташбаев Ш.А., Махсумханов А.А., Алимова Б.Х., Пулатова О.М., Хамидова Х.М. Получение биогаза из отходов табачного производства с использованием ассоциации метанобразующих бактерий // Тезисы докладов 5-го Съезда микробиологов Узбекистана –Ташкент, 2012. С. 43.
14. Махсумханов А.А., Алимова Б.Х., Пулатова О.М., Ташбаев Ш.А., Камбаралиева М.И., Арипов Т.Ф. Изучение хранения сбалансированной метаногенной ассоциации микроорганизмов // Тезисы докладов 5-го Съезда микробиологов Узбекистана –Ташкент, 2012. С. 26-27.
15. Ташбаев Ш.А., Алимова Б.Х., Пулатова О.М., Махсумханов А.А., Арипов Т.Ф. Условия хранения и получение сухих препаратов метаногенной ассоциации микроорганизмов. // Биотехнология: состояния и перспективы развития: VII- Московского международного конгресса.-Москва (Россия), 2013. С.126-127.
16. Ташбаев Ш.А., Алимова Б.Х., Пулатова О.М., Махсумханов А.А.. Анаэробная биоконверсия органических отходов с использованием ассоциации метанобразующих бактерий // Республиканская научно-практическая конференции молодых учёных - Ташкент, 2013. С. 89.
17. Ш.А.Ташбаев, Б.Х.Алимова, А.А.Махсумханов, О.М.Пулатова, Т.Ф.Арипов. Использование метаногенной ассоциации для сбраживания куриного помета // Микробиология және вирусология. Научно-практический журнал .Алматы, Казахстан 2014. № 2 (5). С.95-103.
18. Ташбаев Ш.А., Махсумханов А.А., Пулатова О.М., Алимова Б.Х.. Термофильная метаногенная ассоциация микроорганизмов для биогазовой ферментации // Биотехнология: состояния и перспективы развития: VIII-Московского международного конгресса.-Москва (Россия), 2015. С. 237.
19. Ташбаев Ш.А., Махсумханов А.А., Пулатова О.М., Алимова Б.Х., Холмуродова Н.К. Использование термофильной метаногенной ассоциации

микроорганизмов // “Актуальные проблемы биологии и экологии” Ташкент, 2015. С. 178.

20. Ташбаев Ш.А., Пулатова О.М., Алимова Б.Х., Холмуродова Н.К., Махсумханов А.А.. Термофильное метановое брожения куриного помёта // Микроорганизмы и Биосфера «MICROBIOS-2015»: Материалы Международного Симпозиума – Ташкент, 2015. С. 157-158.

21. Ш.А.Ташбаев., А.А. Махсумханов., О.М. Пулатова., Б.Х. Алимова., Термофил шароитларда парранда гўнгини парчалаб биогаз ва органик ўғит олиш // Ёш олимлар илмий-амалий конференция. Тошкент, 2015. Б. 389

22. Ташбаев Ш.А., Пулатова О.М., Алимова Б.Х., Махсумханов А.А. Получение органического удобрения на основе биогазовой ферментации птичьего помёта // Биотехнология: состояния и перспективы развития: XI-Московского международного конгресса. Москва (Россия), 2015. С. 182-183.

23. Пулатова О.М., Махсумханов А.А., Алимова Б.Х., Ташбаев Ш.А., Холмуродова Н.К. Термофильная метаногенная ассоциация бактерий для сбраживания куриного помета // Современные проблемы биотехнологии: от лабораторных исследований к производству в рамках III международных Фарабиевских чтений. Международная научно практическая конференция – Алматы (Казахстан), 2016. С. 137.

24. Пулатова О.М., Алимова Б.Х., Ташбаев Ш.А., Махсумханов А.А. Мезофильная и термофильная метаногенная ферментация птичьего помёта. Сборник статей VIII международный научной конференции “современные направления в науке и технологии” Ташкент. 2016. С. 230-236.

25. Ташбаев Ш.А., Пулатова О.М., Алимова Б.Х., Махсумханов А.А. Метаноген ферментациядан фойдаланиб товук гўнгидан биогаз олиш // Республиканская научно-практическая конференция, посвященная 80-летию выдающегося ученого биохимика и биотехнолога Узбекистана академика А.Г.Халмурадова. Ташкент. 2019. С. 39-40.

Автореферат «Ўзбекистон биология журналы» таҳририятида таҳрир қилинди.

Босишга рухсат этилди: 12.02.2020 йил  
Бичими 60x84 <sup>1</sup>/<sub>16</sub>. «Times New Roman»  
гарнитурада рақамли босма усулда чоп этилди.  
Шартли босма табағи 3. Адади 100. Буюртма № 13-02

“IMPRESS MEDIA” MChJ босмаҳонасида чоп этилди.  
Тошкент шаҳри, Қушбеги кўчаси, 6-уй.