

Wacława GODLEWSKA-LIPA, Joanna MROZOWSKA

#### WSTĘPNE BADANIA NAD BAKTERIAMI UTLENIAJĄCYMI METAN

**Streszczenie.** W wyniku badań mikrobiologicznych prób pobranych z kopalń węgla kamiennego uzyskano wielogatunkowy zespół bakterii metylotroficznych wykorzystujących  $CH_4$  jako jedyne źródło węgla organicznego. W zespole tym dominowały szczepy bakteryjne zbliżone cechami morfologicznymi i fizjologicznymi do następujących gatunków: *Methylococcus capsulatus*, *Methylococcus luteus*, *Methylococcus minimus*, *Methylococcus chroococcus*, *Methylomonas rubra*. Po uzyskaniu wielogatunkowej kultury metylotrofów opracowano optymalne warunki hodowli sprzyjające szybkiemu przyrostowi biomasy. Aktywność metylotrofów badano metodą pomiaru zużycia w określonych warunkach substratu ( $CH_4$ ) oraz metodą badania aktywności enzymatycznej (dehydrogenaz). Sprawdzono wrażliwość metylotrofów na różne pH środowiska oraz różny stopień jego zasolenia.

#### Wprowadzenie

Badania geomikrobiologiczne wykazały, że bakterie posiadające zdolność do utleniania metanu występują dość powszechnie w przyrodzie w osadach dennych zbiorników wodnych, w glebie w pobliżu złóż ropy naftowej i gazu ziemnego a także wchodzą w skład stałej mikroflory kopalń węgla kamiennego [8, 10, 11, 14, 20, 22, 28], a zatem zasiedlają środowiska ekologiczne, gdzie stale w procesach biogeochemicznych powstaje metan [2]. Metan, najprostszy z grupy n-alkanów, chociaż w przyrodzie występuje dość pospolicie, należy do węglowodorów najtrudniej utlenianych biologicznie, ponieważ tylko nieliczne grupy mikroorganizmów mogą go wykorzystywać jako podstawowy składnik pokarmowy (jedyne źródło węgla organicznego) umożliwiając im przebieg wszystkich procesów metabolicznych a także służący do biosyntezy struktur komórkowych [15, 21]. Grupa bakterii wykorzystująca poza metanem tylko metanol a także metyloaminę zaliczana jest do metylotrofów bezwzględnych [4, 9, 24]. W przyrodzie spotyka się także metylotrofy względne, które poza wyżej wymienionymi związkami metabolizują jeszcze niektóre aminokwasy i kwasy 2,3-karboksylowe [7]. Wśród tych mikroorganizmów oprócz bakterii spotyka się także grzyby z grupy drożdżaków.

Badania nad metylotrofami prowadzone są tylko w nielicznych ośrodkach badawczych na świecie, między innymi w: RFN, Anglii, USA, Indiach ale tylko w ZSRR ukierunkowana są na górnictwo węglowe. W Instytucie Biochemii i Fizjologii Mikroorganizmów AN ZSRR oraz w Moskiewskim Instytucie Górnictwa od kilkunastu lat prowadzone są badania podstawowe nad metylotrofami a jednocześnie na skalę półtechniczną prowadzone są próby wdrożenia me-

tody mikrobiologicznej do odmetanowania kopalń Moskiewskiego Zagłębia Węglowego oraz kopalń Donbasu. Według informacji badaczy radzieckich Instytutu Górnictwa w Moskwie oraz według danych literatury specjalistycznej [16, 17, 18, 19], bakterie utleniające metan mogą zmniejszyć możliwość wyrzutów pyłu węglowego i wybuchu metanu o 30-40%, gdyż w takim stopniu zdolne są do obniżenia stężenia  $CH_4$  w kopalniach. Wprowadzenie metody mikrobiologicznej obok innych metod technologicznych aktualnie stosowanych w górnictwie węglowym mogłoby zatem w znacznej mierze przyczynić się do obniżenia metanonośności pokładu węglowego. Aczkolwiek w ostatnich latach badania nad metylotrofami prowadzone są dość intensywnie, to jednak metody ich hodowli i izolacji, systematyka oraz metabolizm nie są jeszcze dostatecznie poznane. W Polsce badania te zostały zapoczątkowane w 1978 r. w Laboratorium Mikrobiologicznym Instytutu Techniki Eksploatacji Złóż Politechniki Śląskiej i prowadzone są do chwili obecnej.

Celem wstępnych badań nad metylotrofami była izolacja bakterii metylotroficznych z prób pobranych głównie ze środowiska kopalń węgla kamiennego, wyhodowanie aktywnej wielogatunkowej kultury bakteryjnej oraz określenie szczepów w niej dominujących. Ważnym zagadnieniem było opracowanie optymalnych warunków hodowli sprzyjających namnażaniu dużej ilości biomasy a następnie opracowanie metod badania aktywności metylotrofów możliwych do wykorzystania w warunkach kopalnianych. Ponadto przeprowadzono badania nad wpływem niektórych czynników fizykochemicznych na aktywność enzymatyczną bakterii, przy czym za najbardziej istotne uznano te, które mogą mieć wpływ na metabolizm bakterii w warunkach kopalnianych, jak: odczyn środowiska (pH) oraz zasolenie.

Praca została wykonana w ramach problemu węglowego nr O1.4.02, koordynowanego przez Główny Instytut Górnictwa w Katowicach.

#### Metodyka badań

W celu izolacji bakterii metylotroficznych pobrano próby (pył węglowy, wody kopalniane, węgiel, skała płonna a także smary z maszyn górniczych) z kilkunastu kopalń położonych na terenie Górnego i Dolnego Śląska. Aby uzyskać wielogatunkową kulturę bakterii metylotroficznych stosowano wielokrotne pasażowanie pobranego materiału jako metodę naturalnej selekcji prowadzącą do daleko posuniętej eliminacji szczepów bakterii towarzyszących metylotrofom. Hodowlę metylotrofów prowadzono w temp. 22°C z użyciem mieszadeł magnetycznych w specjalnych, hermetycznie zamykanych naczyniach hodowlanych, do których wprowadzono materiał badany, pożywkę mineralną oraz mieszaninę metanu z powietrzem w stosunku 1:4 [15, 5, 27].

Ubytek metanu w naczyniach hodowlanych oznaczano metodą chromatografii gazowej na chromatografie firmy Parkin-Elmer, wobec układu kontrolnego, do którego nie wprowadzano materiału zaszczipiającego. Następnie przeanalizowano wzrost wielogatunkowej kultury metylotrofów na różnych podłożach

hodowlanych: podłożu Malaszenki, podłożu Whittenbury, podłożu "naturalnym" (sporządzonym na wyciągu węglowym) oraz "naturalnym" wzbogaconym w niektóre sole azotowe i fosforowe [12, 15] w dwóch temperaturach 22°C i 30°C, używając do badań kultury bakteryjnej z fazy logarytmicznego wzrostu. Miarą rozwoju bakterii i przyrostu biomasy był pomiar gęstości optymalnej hodowli na aparacie typu "Spekol" z przystawką nefelometryczną. Po ustaleniu optymalnych warunków hodowli przeprowadzono badania diagnostyczne szczepów dominujących w wielogatunkowej kulturze metylotrofów opierając się na wybranych cechach morfologicznych i biochemicznych [5, 15]. Hodowlę metylotrofów na podłożach stałych prowadzono w anaerostatach wypełnionych mieszaniną metanu z powietrzem w stosunku 1:4 przez 5 dni w temp. 30°C.

Aktywność (żywołność) wielogatunkowej kultury bakteryjnej badano dwiema metodami, stosując analogiczny jak opisany już w pierwszej części układ hodowlany oraz optymalne warunki hodowli. Metoda pierwsze obejmowała oznaczenie ubytku substratu ( $\text{CH}_4$ ) metodą chromatografii gazowej w naczyniach hodowlanych, do których wprowadzono różne ilości aktywnej biomasy bakteryjnej. Procent zużycia metanu określano po upływie 2,5 oraz po 5 dobach wobec układu kontrolnego, który stanowiło naczynie hodowlane z pożywką mineralną, mieszaniną gazową lecz bez bakterii.

Metoda druga opierała się na badaniu aktywności enzymatycznej poprzez oznaczenie zredukowanego chlorku 2,3,5-trójfenylotetrazolowego (TTC) do trójfenyloformazanu (TF) przez dehydrogenazy bakterii [1, 24].

Metodę oznaczenia aktywności dehydrogenaz nieco zmodyfikowano [13]. Jako substrat zastosowano mieszaninę gazową (metanu z powietrzem), znacznie wydłużono czas kontaktu bakterii metylotroficznych z TTC (4-5 dni) a następnie po inkubacji wprowadzono dwukrotne wirowanie hodowli. Pierwszy raz w celu oddzielenia biomasy od pożywki, drugi raz po ekstrakcji TF z komórek bakterii metanolem w celu określenia jego stężenia w hodowli metodą kolorymetryczną. Opracowano niezbędne parametry dla dokonywania pomiarów, jak: stężenie i objętość TTC, objętość próby badanej, wiek hodowli i wielkość biomasy, pozwalające na stosowanie jej do badania żywołności bakterii metylotroficznych. Oznaczenie wykonywano na kolorymetrze typu KF-5 przy dł. fali 580 nm. Metodę pomiaru aktywności dehydrogenaz badano wpływ odczynu środowiska oraz różnego stężenia soli na metylotrofy. Odczyn badano w zakresie: pH = 5,6; 6,2; 7,0; 8,0; 9,0, używając pH-metru cyfrowego Typ N-517. Stężenie soli badano w odniesieniu do anionów  $\text{SO}_4^{2-}$  i  $\text{Cl}^-$  stosując  $\text{K}_2\text{SO}_4$  i  $\text{NaCl}$  w następujących dawkach: 100 mg/dcm<sup>3</sup>  $\text{SO}_4^{2-}$  + 50 mg/dcm<sup>3</sup>  $\text{Cl}^-$ ; 200 mg/dcm<sup>3</sup>  $\text{SO}_4^{2-}$  + 150 mg/dcm<sup>3</sup>  $\text{Cl}^-$ ; 400 mg/dcm<sup>3</sup>  $\text{SO}_4^{2-}$  + 250 mg/dcm<sup>3</sup>  $\text{Cl}^-$ ; 500 mg/dcm<sup>3</sup>  $\text{SO}_4^{2-}$  + 350 mg/dcm<sup>3</sup>  $\text{Cl}^-$ . Inkubację prowadzono 4 dni stosując 1 cm<sup>3</sup> 1% TTC.

Wskaźnik aktywności metylotrofów przedstawiono względem hodowli bakterii prowadzonej w warunkach optymalnych, stosując wzór:



$$W = \frac{TF_B}{TF_K} \times 100\%$$

gdzie:

$TF_B$  - stężenie ( $\mu\text{g}$ ) TF w próbce badanej,

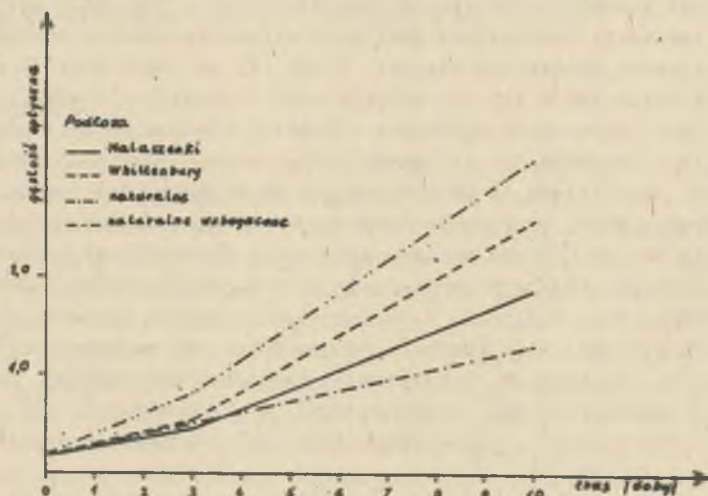
$TF_K$  - stężenie ( $\mu\text{g}$ ) TF w próbce kontrolnej.

Wyniki przedstawione w tabelach i na rysunkach są średnią z wykonywanych równoległe pomiarów z zachowaniem stałych parametrów procesu.

### Wyniki badań i ich dyskusja

Jak wykazały badania mikrobiologiczne prób pobranych z kopalń węgla kamiennego, wśród bogatej mikroflory tak specyficznego środowiska ekologicznego jakim jest kopalnia znajduje się grupa bakterii zaliczanych do metylotrofów. Bakterie te najprawdopodobniej zaadaptowały się do warunków panujących w kopalniach i komponenty chemiczne wchodzące w skład węgla nie wywierają na nie ujemnego działania [6, 17, 20, 22]. Celowe zatem było izolowanie metylotrofów z tego właśnie specyficznego środowiska.

Szybkość namnażania wielogatunkowej kultury bakterii metylotroficznych badano na czterech podłożach mineralnych oraz w dwóch temperaturach. Najbardziej aktywny rozwój bakterii uzyskano na podłożu tzw. "naturalnym" wzbogaconym niektórymi solami mineralnymi, a w następnej kolejności na podłożu Whittenbury, o czym świadczą wyniki przedstawione na rys. 1. Można

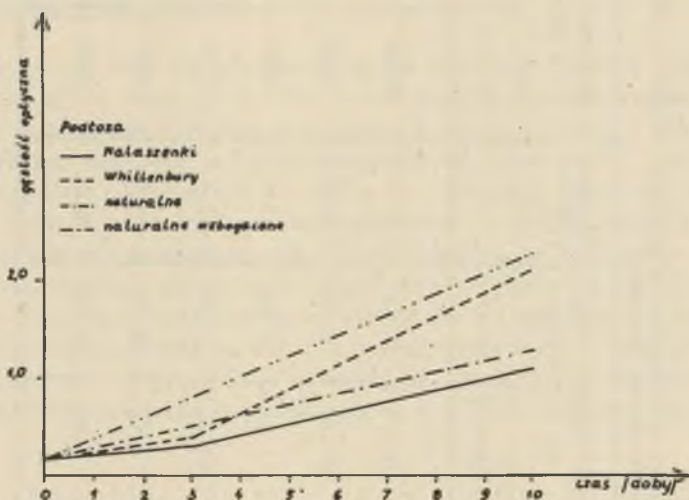


Rys. 1. Wpływ czasu hodowli oraz rodzaju stosowanego podłoża na wzrost bakterii metylotroficznych w temp. 22°C

Tabela 1  
Zależność zużycia metanu od wielkości wprowadzonego inoculum bakterii metylo-troficznych oraz czasu inkubacji

Oznaczenie Gęstość op- tyczna ho- dowli metylo- trofów	Stężenie CH <sub>4</sub> przed inkubacją		Stężenie CH <sub>4</sub> po 2,5 dobach		Spadek stężenia CH <sub>4</sub>	Stężenie CH <sub>4</sub> po 5 dobach		Spadek stężenia CH <sub>4</sub>
	[%/obj.]	[g/dcm <sup>3</sup> ]	[%/obj.]	[g/dcm <sup>3</sup> ]	%	[%/obj.]	[g/dcm <sup>3</sup> ]	%
0,15	24,82	16,46	15,03	9,96	39,4	12,46	8,26	49,8
0,20	24,97	16,55	13,72	9,09	45,0	9,57	6,35	61,6
0,28	24,75	16,40	11,53	7,64	53,4	8,65	5,73	65,0
0,40	24,50	16,24	10,70	7,09	56,3	7,15	4,74	70,8
0,60	24,76	16,40	7,77	5,15	68,6	3,19	2,12	87,1
1,20	24,80	16,45	6,66	4,42	73,1	2,89	1,92	88,3

sądzić, że zastosowanie podłoża sporządzonego na wyciągu węglowym zawiera pewne elementy naturalne, które sprzyjają rozwojowi metylotrofów. Spotrzeżenie to jest interesujące, bowiem obniżyłoby koszt wdrożenia tej nowej metody, ale wymaga znacznie dokładniejszych badań. Analizując temperatury stosowane przy hodowli bakterii (rys. 2) stwierdzono, że znacznie wyższe wartości przyrostu biomasy uzyskiwano w temp. 30°C. Wydaje się, że jest to ekologicznie uzasadnione, gdyż jest to temperatura zbliżona do środowiska kopalnianego i bakterie wyizolowane z tego środowiska nie wymagają dodatkowego czasu na adaptację do nowych warunków termicznych.

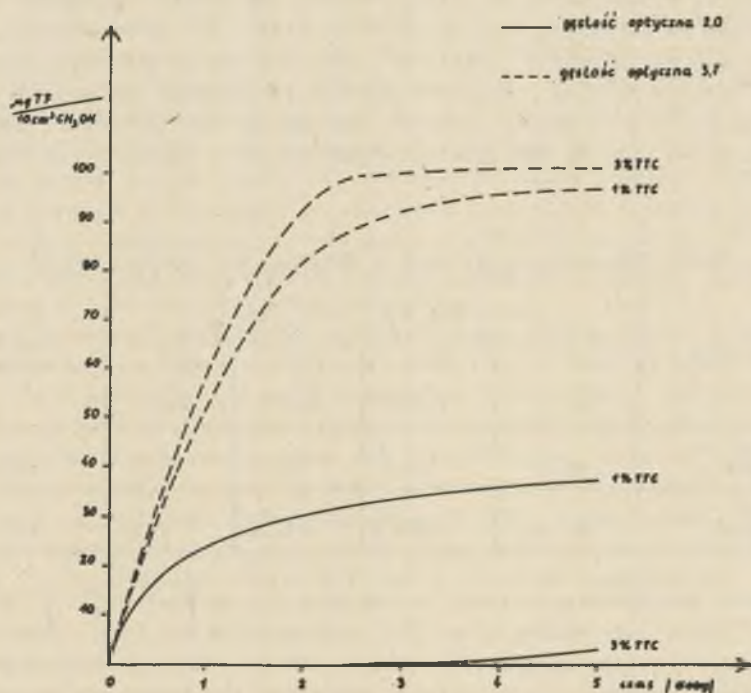


Rys. 2. Wpływ czasu hodowli oraz rodzaju stosowanego podłoża na wzrost bakterii metylotroficznych w temp. 30°C

Wstępne badania diagnostyczne wykonane w oparciu o pracę Malaszenki i in. (Malaszenko i inni 1978) wykazały, że w wielogatunkowej kulturze metylotrofów dominowały szczepy bakterii należące do dwóch rodzajów: *Methylomonas* oraz *Methylococcus* oraz zbliżone były do następujących gatunków: *Methylococcus capsulatus*, *Methylococcus minimus*, *Methylococcus luteus*, *Methylococcus chroococcus*, *Methylomonas rubra*. Dokładne określenie gatunków wymaga dalszych szczegółowych badań z zakresu biologii molekularnej oraz mikroskopii elektronowej. Szybkość zużycia metanu przez metylotrofy w zależności od czasu oraz wielkości biomasy przedstawiono w tabeli 1. Uzyskane wyniki świadczą o tym, że procent zużycia  $CH_4$  w danym czasie jest tym większy im więcej w układzie hodowlanym znajduje się bakterii. Można go również zwiększyć wydłużając maksymalnie czas kontaktu bakterii z tym substratem. Wielkość biomasy jest czynnikiem bardzo ważnym, chociaż zapewne nie jedynym wpływającym na wydajność procesu utlenienia

metanu. Przy znacznym zagęszczeniu hodowli i wydłużonym czasie, następuje jakby osłabienie wydajności reakcji, o czym świadczą dwa ostatnie wyniki uzyskane po 5-dobowej inkubacji. Następuje tutaj najprawdopodobniej nagromadzenie się egzometabolitów, które wpływają ujemnie na aktywność bakterii. Z tego też względu niektórzy autorzy [3, 26] twierdzą, że korzystniej jest stosować zespoły bakteryjne, w skład których wchodzi również inne bakterie heterotroficzne. Wykorzystują one bowiem wtórne produkty metabolizmu metanu (a także innych n-alkanów) odtruwając tym samym środowisko.

Reasumując przeprowadzone badania metodyczne [13] nad aktywnością enzymatyczną (dehydrogenaz) metylotrofów, stwierdzono, że aby uzyskać wyniki porównywalne i w stosunkowo krótkim czasie należy do badań używać kultur bakteryjnych z późnej fazy logarytmicznego wzrostu (o dużej biomacie), ustalić czas inkubacji oraz stężenie TTC (rys. 3). Istotną sprawą jest, aby oznaczanie aktywności dehydrogenaz prowadzić w nadmiarze substratu



Rys. 3. Wpływ czasu hodowli na ilość wytworzonego trójfenylotformazanu (TF) przy stosowaniu różnej biomasy bakterii oraz różnego stężenia chlorku 2, 3,5-trójfenylotetrazolowego (TTC)

( $\text{CH}_4$ ) w mieszaninie z powietrzem. Opracowana metoda pomiaru aktywności metylotrofów może znaleźć zastosowanie w warunkach kopalnianych przy wdrażaniu metody mikrobiologicznej do obniżenia potencjału gazowego  $\text{CH}_4$  w ko-



palni. Zaletą bowiem tej metody jest to, że daje ona ocenę żywotności kultur, a więc ich potencjalną zdolność do usuwania  $\text{CH}_4$  bez analizy gazowej substratu, produktu czy też przyrostu biomasy.

Tabela 2

Wpływ odczynu podłoża na aktywność bakterii metylotroficznych

pH	5,6	6,2	7,0	8,0	9,0
Oznaczenie					
$\mu\text{g TF}/10 \text{ ml}$ metanolu	3,0	60,0	71,0	54,0	6,5
Wskaźnik aktywności	4,22	84,50	100,0	76,05	9,15

Metodę tę wykorzystano do badania wpływu niektórych czynników fizykochemicznych na aktywność metylotrofów. Wykazano, że pH ma zasadniczy wpływ na żywotność metylotrofów (tabela 2). Odczyn obojętny jest najbardziej optymalny dla ich rozwoju, natomiast zbytne zakwaszenie ( $\text{pH} = 5,6$ ) lub alkalizacja ( $\text{pH} = 9,0$ ) wpływa wyraźnie hamująco na ich aktywność. Wpływ stężenia badanych soli na metylotrofy przedstawiono w tabeli 3. Na podstawie

Tabela 3

Wpływ zasolenia na aktywność bakterii metylotroficznych

Oznaczenia	Stężenie $\text{SO}_4^{2-} + \text{Cl}^- \text{ mg/l}$				Kontrola wzrostu
	100 + 62,5	200 + 125,0	400 + 250	500 + 350	
$\mu\text{g TF}/10 \text{ ml}$ metanolu	45,2	30,0	22,7	10,0	66,0
Wskaźnik aktywności	68,48	45,45	34,39	1,51	100,0

uzyskanych wyników stwierdzono, że stężenie  $400 \text{ mg/dcm}^3 \text{ SO}_4^{2-}$  i  $250 \text{ mg/dcm}^3 \text{ Cl}^-$ , jakie jest według normy [25] dopuszczalne dla wód kopalnianych, powoduje już znaczne zahamowanie wzrostu bakterii metylotroficznych. Aby nie nastąpiło zatem w sposób istotny obniżenie żywotności metylotrofów stężenie soli w środowisku powinno być co najmniej czterokrotnie niższe. Ponieważ wody kopalniane często mają odczyn silnie kwaśny i charakteryzują się silnym zasoleniem należy mieć to na uwadze przy planowaniu ewentualnych eksperymentów w kopalni. Kontakt bowiem bakterii z takim środowiskiem będzie miał hamujący wpływ na ich aktywność, a co za tym idzie na przebieg procesu utleniania metanu.



Podsumowanie

Wstępne badania nad metylotrofami wykazały że:

1. W skład naturalnej mikroflory środowiska kopalń węgla kamiennego wchodzi bakterie metylotroficzne, wykorzystujące  $\text{CH}_4$  jako jedyne źródło węgla i energii.

2. Optymalne warunki hodowli sprzyjające namnażaniu biomasy to: stosowanie mieszaniny metanu z powietrzem w stosunku 1:4, podłoża "naturalnego" wzbogaconego solami azotowymi i fosforowymi lub podłoża Whittenbury oraz temp.  $30^\circ\text{C}$  przy użyciu mieszadeł magnetycznych.

3. Dominujące szczepy w wielogatunkowej kulturze bakterii metylotroficznych zbliżone są do następujących gatunków: *Methylococcus capsulatus*, *Methylococcus luteus*, *Methylococcus minimus*, *Methylococcus chroococcus*, *Methylococcus rubra*.

4. Aktywność metylotrofów określona procentem zużytego substratu ( $\text{CH}_4$ ), zależy od ich ilości w danym układzie hodowlanym oraz czasu inkubacji (przy założeniu, że stosuje się kulturę z fazy logarytmicznego wzrostu).

5. Zbytne zagęszczenie hodowli może wpłynąć niekorzystnie na efekt utleniania metanu, ponieważ prowadzi do gromadzenia się wtórnych egzometabolitów, wpływających niekorzystnie na żywotność metylotrofów.

6. Aktywność a zatem żywotność metylotrofów można określić metodą pomiaru aktywności dehydrogenaz po ustaleniu optymalnych warunków dla przebiegu reakcji enzymatycznej prowadzonej w nadmiarze substratu ( $\text{CH}_4$ ). Oznaczenie aktywności dehydrogenaz może mieć duże zastosowanie w warunkach kopalnianych jako wskaźnik żywotności kultur.

7. Na aktywność metylotrofów mogą mieć wpływ ujemny kwaśne a także zbyttno zasolone wody kopalniane, bowiem optymalne pH dla tej grupy bakterii mieści się w granicach 6,2 do 8,0, natomiast stężenie soli  $400 \text{ mg/dcm}^3 \text{ SO}_4$  oraz  $250 \text{ mg/dcm}^3 \text{ Cl}$  i powyżej powoduje zahamowanie wzrostu bakterii.

8. Stopień zaawansowania badań nad metylotrofami pozwala sądzić, iż proponowana metoda mikrobiologiczna powinna znaleźć zastosowanie na skalę techniczną do obniżenia potencjału gazowego  $\text{CH}_4$  w kopalniach węgla kamiennego. Wdrożenie jednak tej metody wymaga dalszych eksperymentów w warunkach laboratoryjnych, a nade wszystko w warunkach kopalnianych.

## LITERATURA

- [1] Altman F.P.: An introduction to the use of Tetrasolinum Salts in Qualitative Enzyme Cytochemistry. Koch-Light, Laboratory, Amstelslad: 1-45. 1972.
- [2] Barker H.A.: Biological formation of methane. Ind. Engng. Chem. 48. 1956.
- [3] Bryant M.P., Wolin M.J., Wolfe R.S.: Methanobacillus omelianski a symbiotic association of two species of bacteria. Arch. Microbiol., 59. 1967.

- [4] Dijken van J.P., Marder W.: Growth Yields of Microorganisms on methanol and methane. A. teoretical study. Biotechn. Bioengin. 17: 15-30. 1975.
- [5] Galczenko B.F., Sziškina W.N., Tjurin W.S., Trocenco Ju.A.: Wydżelenije czistykh kultur Methanotrofov i ich swojstwa. Mikrobiol. 5: 844-850. 1975.
- [6] Godlewska-Lipa W.A.: Zwalczenie zagrożeń gazowych w kopalniach węgla kamiennego przy udziale bakterii. Przegląd Górniczy 6: 257-261. 1979.
- [7] Goldberg L., Rock J.S., Bassat A., Matales R.J.: Bacterial Yields on Methanol, Methylamine, Formaldehyde and Formate. Biotech. Bioengin., 17: 1957-1668. 1976.
- [8] Ivanow M.W., Nesterow A.J., Namsarew W.W., Galczenko W.F., Nazarenko A.W.: Rasprostranienije i geochemiczeskaja dejatelnost' metanotrofnych bakterii w wodach ugotnych szacht. Mikrobiol., 3: 489-493. 1978.
- [9] Kluyver A.J., Schnellen C.: On the fermentation on carbon monoxide by pure cultures of methane bacteria. Arch. Biochem., 14. 1947.
- [10] Kozłowski B., Godlewska-Lipa W.A., Piotrowicz J., Porańska I.: Metoda obniżenia potencjału gazowego CH<sub>4</sub> przez zastosowanie metod bakterieryjnych. Sprawozdanie - cz. I. Inst. Techn. Ekspł. Złóż Politechniki Śląskiej. 1978.
- [11] Kozłowski B., Godlewska-Lipa W.A., Piotrowicz J., Foik H.: Metoda OPG-1 obniżenia potencjału gazowego CH<sub>4</sub> przez zastosowanie bakterii. Sprawozdanie - cz. II. Inst. Techn. Ekspł. Złóż Politechniki Śląskiej Gliwice. 1979.
- [12] Kozłowski B., Godlewska-Lipa W.A., Mrozowska J.: Metoda OPG-1 obniżenia potencjału gazowego CH<sub>4</sub> przez zastosowanie bakterii. Sprawozdanie - cz. III. Inst. Techn. Ekspł. Złóż Politechniki Śląskiej Gliwice. 1980.
- [13] Kozłowski B., Godlewska-Lipa W.A., Mrozowska J.: Metoda OPG-1 obniżenia potencjału gazowego CH<sub>4</sub> przez zastosowanie bakterii. Sprawozdanie - cz. IV. Inst. Techn. Ekspł. Złóż. Politechniki Śląskiej Gliwice. 1981.
- [14] Kuźnieccow S.J.: Raspredielenije w oziarach bakterii okisljajuszczich gazoobraznyje i żydkije uglewodorody. Mikrobiol. 16 5. 1947.
- [15] Malaszenko J.R., Romanowskaja W.A., Trocenco J.A.: Metanokislajuszczije mikroorganizmy. Wyd. Nauka, Moskwa 1978.
- [16] Moskalenko E.M., Nesterow A.J.: O mikrobiologiczeskom metodje borby z metanom w ugotnych płastach. Mikrobiologiczeskaja Promysz. 1 121: 39-41. 1975.
- [17] Nazarenko A.W., Nesterow A.J., Walkow A.J., Syslenko W.: Potreblenije metana mikroorganizmami w usłowiah kontakta a kamiennym uglem. Prikład. Biochem. Mikrobiol. 10 5 : 741-744. 1974.
- [18] Nesterow A.I., Szirokow O.G.: Charakter dazintegracji metanokislajuszczich bakterii pri ich filtracji pod dawleniem czjerez kamiennyj ugot. Prikładnaja Biochemia i Mikrobiologia 1. 148-151. 1973.
- [19] Nesterow A.J., Mzenskij J.N., Galczenko W.F., Namsaraew W.W., Ilczenko W.J.: Sprawnitelnoje izuczenije parametrov rosta metanotrofnych bakterii. Mikrobiol. 1:10-14. 1977.
- [20] Nesterow A.J., Nazarenko A.W., Moskalenko E.M., Smoljanikow N.G.: Kamiennyj ugot kak specyficzeskaja sreda opitanija metanookislajuszczich bakterii pri ich ispolzowanii sniženija metanonosnosti ugotnych plastow. Mikrobiol. Promyszl. 1 121 : 42-45. 1975.
- [21] Overbeck J., Ohle W.: Contributions to the biology of methane-oxidizing bacteria. Ver. Inr. Verein. Limnol. 15: 535-543. 1964.
- [22] Rogoff M.H.: Microbiology of coal. Unit. State. Dep. of Int. Library Bureau of Mines. 1962.

- [23] Sziszkina W.N., Jurczenko W.A., Romanowskaja W.A., Małaszenko J.R., Trocenko I.A.: Ob alternatiwnosti putjej assimilacji metana u obli-gatnyh metiloforow. Mikrobiologia 3. 417-419. 1976.
- [24] Simon P., Dore M.: Studes des parametres du desage des dehydrogenases le TTC applique au actives. Cebedeau-Becewa 403/404: 252-265. 1977.
- [25] Szynal A.: Gospodarka wodna w zakładach przemysłowych. Skrypt Poli-techniki Śląskiej, Gliwice 1972.
- [26] Wilkinson T.G., Topiwala H.N., Hamer G.: Interaction in a mixed bac-terial population growing on methane in continous culture. Biotech. Bioenging. 16: 41-59. 1974.
- [27] Wittenbury R., Philips K.C., Wilkinson J.F.: Environment isolation and some properties of methane - utilizing bacteria. J. Gen. Micro-biol. 61: 205-215. 1970.
- [28] Zehender A.: Oekologie der Methanobacterien. Juris Druck Verlag Zu-rich. 1976.

Recenzent: Prof. dr hab. inż. Jerzy KARASKIEWICZ

Wpłynęło do Redakcji 29.03.1982 r.

#### ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ БАКТЕРИЙ ОКИСЛЯЮЩИХ МЕТАН

#### Р е з ю м е

В результате микробиологических исследований проб извлеченных из камен-ноугольной шахты была получена многосортная группа метилтрофических бакте-рий использующих  $\text{CH}_4$  как единственный источник углерода. В этой группе пре-обладали штаммы бактерий близкие по морфологическим и физиологическим чер-там к следующим породам: *Methylococcus capsulatus*, *Methylococcus luteus*, *Methylococcus minimus*, *Methylococcus chroococcus*, *Methylomonas rubra*. По-сле получения многосортной культуры метилтрофов были разработаны оптималь-ные условия культуры, способствующие быстрому росту биомассы. Активность ме-тилтрофов была исследована путем измерения износа в определенных условиях субстрата ( $\text{CH}_4$ ) и путем исследования энзиматической активности (дегидроге-наза). Были проверены чувствительность метилтрофов на разине pH среды и разная степень ее засоленности.



## PRELIMINARY RESEARCH ON BACTERIA OXYGENATING METHAN

## S u m m a r y

As the result of microbiological tests of samples taken from coal mines a set of many species of methylotrophic bacteria has been obtained. The bacteria use  $\text{CH}_4$  as the only source of coal. Bacterial strains close in their morphologic and physiologic features to the following genera: *Methylococcus capsulatus*, *Methylococcuss luteus*, *Metylococcus minimus*, *Metylococcuss chroococcus*, *Methylomonas rubra* have dominated in that set. After obtaining bacterial culture optimal conditions conducive for quick growth of culture's standing population have been worked out. The activity of methylotrophic bacteria has been studied using the method of measuring consumption of a substrate ( $\text{CH}_4$ ) in given conditions and using the method of examining enzymatic activity (of dehydrogenases). Methylotrophic bacteria's sensitivity to different pH of their environment and to different degree of its salinity has been tested.