

Никитина Анна Александровна

**Биотехнологические и микробиологические аспекты
термофильной анаэробной переработки коммунальных органических
отходов при высокой нагрузке по субстрату**

Специальности 03.02.03 – микробиология и 03.01.06 – биотехнология
(в том числе бионанотехнологии)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2019

Работа выполнена в лаборатории микробиологии антропогенных мест обитания Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского Федерального государственного учреждения "Федеральный исследовательский центр "Фундаментальные основы биотехнологии" Российской академии наук" (ФИЦ Биотехнологии РАН)

**Научный
руководитель**

Литти Юрий Владимирович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории микробиологии антропогенных мест обитания Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского Федерального государственного учреждения "Федеральный исследовательский центр "Фундаментальные основы биотехнологии" Российской академии наук"

**Научный
консультант**

Ножевникова Алла Николаевна, доктор биологических наук, главный научный сотрудник, заведующая лабораторией микробиологии антропогенных мест обитания Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского Федерального государственного учреждения "Федеральный исследовательский центр "Фундаментальные основы биотехнологии" Российской академии наук"

**Официальные
оппоненты:**

Архипченко Ирина Александровна, доктор биологических наук, специальность 03.01.06 – биотехнология, заведующая лабораторией микробной экотехнологии ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии

Щербакова Виктория Артуровна, кандидат биологических наук, специальность 03.02.03 – микробиология, заведующая лабораторией анаэробных микроорганизмов Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук»

**Ведущая
организация:**

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», биологический факультет

Защита состоится **06 февраля 2019 г. в 11-00** на заседании диссертационного совета Д002.247.02 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, на соискание ученой степени кандидата наук на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского по адресу: 117312, Москва, проспект 60-летия Октября, д. 7, корп. 2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИНМИ РАН (117312, Москва, проспект 60-летия Октября, д. 7, корп. 2) и на сайте ФИЦ Биотехнологии РАН <http://www.fbras.ru/>.

Автореферат разослан « ____ » _____ 201 ____ года

Учёный секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Хижняк Татьяна Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Основными коммунальными отходами являются твердые бытовые отходы (ТБО) и осадки, образующиеся в процессе очистки сточных вод (ОСВ). По последним оценкам в России ежегодно образуется около 60 млн т ТБО и около 20 млн т ОСВ, объем которых ежегодно возрастает на 3–4%. До 90% образующихся коммунальных отходов утилизируются путем захоронения на полигонах ТБО, которые в связи со своей устаревшей организацией являются источниками загрязняющих веществ (парниковые газы, вредные выбросы, загрязненные фильтрационные воды и т.д.), оказывают долгосрочное негативное воздействие на окружающую среду и здоровье населения (Пупырев, 2006; Ножевникова и др., 2016; Fisgativa et al., 2016; Namsaraev et al., 2018).

Анаэробное метановое сбраживание является наиболее перспективной технологией переработки коммунальных и других видов органических отходов. Применение технологии анаэробного сбраживания позволяет значительно снизить экологическую нагрузку на окружающую среду и получить ценные продукты, биогаз и биоудобрение. Метан, основной компонент биогаза, может быть использован для получения тепловой и электрической энергии (Khalid et al., 2011; Bolzonella et al., 2013; Astals et al., 2014; Fisgativa et al., 2016; Schnurer, 2016; Ahmadi-Pirlou et al., 2017; Zahan et al., 2018). Теоретические расчеты показали, что использование образующихся коммунальных отходов для производства биогаза позволит компенсировать около 7,7% годового энергопотребления России (Namsaraev et al., 2018).

Анаэробное сбраживание в мезофильных условиях (30–35°C) наиболее распространено в мире (De la Rubia et al., 2013; Ножевникова и др., 2016). Однако термофильное (50–57°C) сбраживание имеет ряд существенных преимуществ, связанных с увеличением скорости роста микроорганизмов и осуществляемых ими реакций, более глубоким разложением органического вещества (ОВ) за счет повышения растворимости органических соединений (Moen et al., 2003; Bolzonella et al., 2012). Повышенная температура процесса позволяет добиться обеззараживания отходов от патогенных организмов (бактерий, вирусов, яиц гельминтов), что необходимо для дальнейшего использования сброженной биомассы в качестве биоудобрения (Kim et al., 2006; Chen et al., 2008; De la Rubia et al., 2013; Но et al., 2013). Высокие капитальные затраты на строительство биореакторов, прямо пропорциональные их размерам, являются одним из основных факторов, сдерживающих широкое распространение технологии анаэробного сбраживания. Поэтому актуальными являются исследования, направленные на повышение производительности существующих и новых биореакторов. В настоящее время наиболее перспективными методами увеличения производительности реакторов считаются ко-ферментация различных видов органических отходов, снижение влажности субстратов и повышение нагрузки по ОВ. Ко-ферментация ОСВ и органической фракции ТБО позволяет сбалансировать состав питательных веществ и влажность смеси, а также увеличить разнообразие микроорганизмов, участвующих в деградации отходов (Khalid et al., 2011; Mata-Alvarez et al., 2011, Esposito et al., 2012; Shah et al., 2014). Снижение влажности субстратов позволяет снизить потребление воды, расходы на обезвоживание сброженной биомассы и очистку фильтрационных вод, тепловые потери и энергоемкость процесса (Duan et al., 2012; Hidaka et al., 2013;

Liotta et al., 2014). Повышение нагрузки позволяет увеличить скорость образования и выход биогаза (Khan et al., 2016; Shen et al., 2018). Снижение влажности сбраживаемой смеси является одним из способов обеспечения более высокой нагрузки на реактор. Для повышения эффективности разделения жидкой и твердой фаз различных отходов, широко используют флокулянты, в особенности на основе полиакриламида (ПАА) (Campos et al., 2008; Lu et al., 2014; Lee et al., 2014). Обработанные флокулянтами отходы в дальнейшем подвергаются стандартной переработке, однако, данные о влиянии ПАА на процесс анаэробного сбраживания отходов в термофильных условиях и при сниженной влажности отсутствуют.

Основным условием для эффективной работы высокопроизводительных биореакторов является поддержание стабильности процесса, т.к. с увеличением нагрузки повышается риск дестабилизации анаэробного сбраживания, особенно в термофильных условиях, вследствие избыточного накопления летучих жирных кислот (ЛЖК) и последующего снижения pH. Это связано с тем, что скорость роста и активность гидролитических и кислотогенных микроорганизмов выше, чем у метаногенных архей, осуществляющих с помощью синтрофных бактерий стадию трансформации промежуточных метаболитов, в первую очередь водорода и ЛЖК, в метан. При превышении определенной концентрации, ЛЖК обладают ингибирующим воздействием на метаногенное микробное сообщество, что может привести к снижению скорости процесса, вплоть до ее полной остановки (Wang et al., 2009; Duan et al., 2012; Fotidis et al., 2013; Chu et al., 2015). Изучение синтрофных микробных ассоциаций, участвующих в процессе анаэробного разложения отходов может служить ключом для понимания способов регуляции работы биореакторов с высокой нагрузкой по ОВ.

Цель и задачи работы

Целью работы было изучение процесса термофильной анаэробной переработки коммунальных органических отходов в условиях повышения нагрузки по субстрату и снижения влажности, а также синтрофных бактерий и метаногенных архей, участвующих в этом процессе.

Для достижения цели работы были поставлены следующие *задачи*:

1) изучить процесс термофильного сбраживания смешанных коммунальных органических отходов со сниженной влажностью в периодическом режиме во флаконах и в лабораторном биогазовом реакторе непрерывного действия, а также влияние различных факторов на скорость и эффективность процесса (выбор субстратов, инокулятов и оптимального соотношения инокулят/субстрат, внесение флокулянтов);

2) получить метаногенные консорциумы, устойчивые к высокой концентрации ЛЖК, исследовать их активность в условиях неблагоприятного соотношения инокулята к субстрату и избыточного накопления ЛЖК в сбраживаемой смеси;

3) изучить микробный состав устойчивого к высоким концентрациям бутирата метаногенного консорциума, выделить и изучить чистые культуры.

Научная новизна и значимость результатов работы

Подобран эффективный инокулят для инициации процесса анаэробной ко-ферментации пищевых отходов и избыточного активного ила. Определено оптимальное соотношение инокулята к субстрату для запуска процесса анаэробного сбраживания ОСВ со сниженной влажностью. Проведено комплексное исследование

термофильной анаэробной ко-ферментации ОСВ и органической фракции ТБО с выявлением оптимального соотношения субстратов в смеси и нагрузки по ОВ.

Впервые исследовано влияние катионного полиакриламидного флокулянта на процесс термофильного анаэробного сбраживания органических отходов при сниженной влажности. Впервые показана возможность использования флокулянта для восстановления метаногенеза в анаэробных биореакторах, процесс разложения отходов в которых дестабилизирован вследствие избыточного накопления ЛЖК.

Получены высокоэффективные метаногенные консорциумы, устойчивые к высоким концентрациям ЛЖК. Показана смена основного пути метаногенеза с ацетокластического на гидрогенотрофный, сопряженный с синтрофным окислением ацетата, при высоких концентрациях бутирата и ацетата в среде. Выделена новая термофильная бактерия, способная к синтрофному росту с гидрогенотрофным метаногеном на среде с лактатом и глицерином. На основании анализа генома и физиологии выделенного штамма и сравнения с ближайшими филогенетически родственными видами микроорганизмов, выделенная бактерия отнесена к новому виду нового рода, для которого предложено название '*Thermocaenobacter saccharolyticus*'.

Практическая значимость работы

Результаты работы могут быть использованы для создания новых высокопроизводительных технологий анаэробной переработки органических отходов со сниженной влажностью субстратов и высокой нагрузкой по ОВ. Отработана стратегия запуска биореактора с высокой нагрузкой, позволяющая избежать дестабилизации процесса. Показано, что полиакриламидный флокулянт может быть использован для восстановления метаногенеза в дестабилизированных вследствие избыточного накопления ЛЖК биореакторах. Полученные метаногенные консорциумы, устойчивые к высоким концентрациям ЛЖК, позволяют значительно повысить эффективность и стабильность анаэробного сбраживания.

Апробация работы

Основные результаты работы были представлены на международных и российских конференциях и конгрессах: 1) IX, X, XI, XII Молодежная школа – конференция с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии», Москва, Россия, 2014, 2015, 2016, 2017; 2) VII, VIII Московский международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития», Москва, Россия, 2014, 2015; 3) 10th International Congress on Extremophiles, St-Petersburg, Russia, 2014; 4) Международная конференция по биоорганической химии, биотехнологии и бионанотехнологии, посвященной 55-летию Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук и 80-летию со дня рождения академика Ю.А. Овчинникова, Москва, Россия, 2014; 5) Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов», Москва, Россия, 2015, 2018; 6) 19 Международная Пуцинская школа – конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века», Пушкино, Россия, 2015; 7) XII Latin American Symposium and Workshop on anaerobic digestion, Cusco, Peru, 2016.

Публикации

Материалы диссертации содержатся в 21 печатных работах, включая 3 экспериментальные статьи в журналах, рекомендованных ВАК, 2 статьи в других изданиях, 15 тезисов конференций и 1 патент.

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, глав, заключения и выводов, изложенных на 163 страницах, включая 34 таблиц, 30 рисунков и списка литературы из 215 наименований, из них 9 – на русском и 206 – на английском языке.

Место проведения работы и благодарности

Работа выполнена в лаборатории Микробиологии антропогенных мест обитания Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского ФИЦ Биотехнологии РАН с 2012 по 2018 годы. Исследования на лабораторном анаэробном биогазовом реакторе проводили совместно с сотрудниками ФГБНУ "Федеральный научный агроинженерный центр ВИМ" к.т.н. Ковалевым Д.А. и к.т.н. Ковалевым А.А. Молекулярное клонирование, секвенирование гена 16S рРНК и полного генома штамма SP2 проводили совместно с сотрудниками лаборатории молекулярной диагностики Институт Биоинженерии ФИЦ Биотехнологии РАН под руководством к.б.н. Д.С. Груздева.

Автор выражает глубокую признательность научному руководителю к.б.н. Литти Ю.В. за полезные советы, внимание на всех этапах работы и дружескую поддержку, научному консультанту д.б.н. Ножевниковой А.Н. за интересные идеи и воспитание широты научных взглядов, к.б.н. Каллистовой А.Ю. за помощь в работе с консорциумами, к.б.н. Паршиной С.Н. за помощь в работе с чистыми культурами, а также всем сотрудникам лаборатории Микробиологии антропогенных мест обитания за помощь и поддержку. Автор выражает благодарность к.т.н. Ковалеву Д.А. и к.т.н. Ковалеву А.А. за помощь в работе на биогазовом реакторе и к.б.н. Груздеву Д.С. за помощь в проведении молекулярно-биологических исследований.

Работа выполнена при поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (№14-04-92696 ИНД_а), Министерства образования и науки РФ (№14.607.21.0024 и №14.604.21.0190).

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Объектами исследования эффективности анаэробной ферментации при повышенной нагрузке по ОВ и сниженной влажности были процессы с использованием различных видов органических отходов (субстратов): модель органической фракции твердых бытовых отходов (ОФ-ТБО) (комбикорм СК-8), пищевые отходы, модель первичного ОСВ (корм для собак), избыточный активный ил, ОСВ (смесь первичного и вторичного осадка); и инокулятов: грунт полигона ТБО (г. Сочи), термофильно сброженный ОСВ (г. Москва). Объектами исследования в микробиологической части работы являлись метаногенные консорциумы, устойчивые к высоким концентрациям ЛЖК, полученные из термофильно сброженного ОСВ Курьяновских очистных сооружений (г. Москва).

В эксперименте по анаэробной ко-ферментации органических отходов в периодическом режиме в качестве субстратов использовали пищевые отходы и избыточный активный ил в соотношении 80/20 по ОВ. В качестве инокулятов использовали уплотненный сброженный ОСВ, прессованный сброженный ОСВ и

суспензию, приготовленную из грунта анаэробной зоны полигона ТБО. Количество инокулята составляло от 20% до 50% по ОВ. Исходная влажность сбраживаемых смесей составляла 92–93%. Эксперименты проводили во флаконах объемом 500 мл при температуре 50°C. **В экспериментах по определению оптимального соотношения инокулята к субстрату и по определению влияния катионного полиакриламидного флокулянта (ПАА) на процесс анаэробного сбраживания ОСВ с низкой влажностью** в качестве субстратов использовали модельный первичный осадок и избыточный активный ил, в качестве инокулята – сброженный ОСВ. **Эксперименты по определению биodeградability и токсичности ПАА-флокулянта "Праэстол 650" (Ashland, Германия)** проводили во флаконах объемом 120 мл. В качестве инокулята использовали уплотненный сброженный ОСВ (3 г), который разбавляли витаминно-минеральной средой до объема 50 мл. При определении токсичности ПАА использовали в качестве субстрата смесь ацетата, пропионата и бутирата. **Эксперименты по ко-ферментации ОФ-ТБО и ОСВ в непрерывном режиме** проводили в лабораторном биогазовом реакторе объемом 0,05 м³, сконструированном к.т.н. Д.А. Ковалевым и к.т.н. А.А. Ковалевым. Реактор находится на территории ФГБНУ "Федеральный научный агроинженерный центр ВИМ". В качестве субстратов использовали пищевые отходы, модельную органическую фракцию ТБО, ОСВ, в качестве инокулята – сброженный ОСВ. Сбраживание проводили при температуре 55°C. Загрузка новой порции субстрата осуществлялась 1 раз в сут. Время удержания – 10 сут.

Метаногенные консорциумы, устойчивые к высоким концентрациям ЛЖК, получали путем последовательного пересева на среду Пфеннига (Pfennig, 1965), с возрастающей концентрацией субстратов (пропионат, бутират). Источником анаэробных микроорганизмов служил сброженный ОСВ (10%). **Проверку эффективности полученных консорциумов** проводили в эксперименте по сбраживанию органической фракции ТБО при исходных соотношениях инокулята к субстрату 50/50 и 20/80. Основной инокулят (сброженный ОСВ) вносили в соотношении 1/1 по объему со смешанным метаногенным консорциумом. **Выделение чистых культур** проводили с использованием метода серийных разведений, посева на плотную питательную среду – модифицированной методики Хангейта (Hungate, 1969), с использованием специфических ингибиторов роста (антибиотики, бромэтансульфоновая кислота). **Описание новой бактерии** проводили согласно общепринятой схеме. **Изучение морфологии и подсчет численности клеток** проводили с помощью микроскопов AxioLab.A1 и AxioImager.D1 (Carl Zeiss, Германия) с фазово-контрастным устройством. Для изучения микроструктуры клеток, включений и жгутиков использовали трансмиссионный электронный микроскоп JEOL 100С XII (Япония).

Аналитические методы. Общее содержание сухого вещества (СВ) в образцах определяли после высушивания до постоянной массы при 105°C. Зольный остаток определяли после сжигания сухого образца в муфельной печи до постоянной массы при 650°C. Органическое вещество (ОВ) вычисляли как разность между сухим весом образца и зольным остатком. Содержание газообразных продуктов (Н₂, СН₄, СО₂) и летучих жирных кислот (ЛЖК) определяли на хроматографе Хроматэк-Кристалл 5000.2 (Россия). Содержание общего аммонийного азота в жидкой фракции определяли с помощью методик производителя для спектрофотометра DR5000 (Hach

Lange GmbH, Germany). Измерение pH проводили с помощью портативного pH-метра 320 (WTW, Германия).

Молекулярные методы. Исследование микробного состава накопительных культур и идентификацию новых изолятов проводили с помощью амплификации гена 16S рРНК, молекулярного клонирования и секвенирования по методу Сэнгера (Sanger, 1977). Редактирование и анализ полученных данных проводили с помощью следующих программ: Chromas, NCBI Blast, Find Chimeras, BioEditv 7.0.0, Mega 5.2. Геномные библиотеки для анализа генома штамма SP2 создавали с помощью набора NEBNext DNA library prep с последующим секвенированием с использованием секвенатора Illumina HiSeq 1500. Оценку качества первичных последовательностей, сборку длинных фрагментов и филогенетический анализ проводили в соответствии с ранее описанными методиками (Bankevich et al., 2012; Tatusova et al., 2013; Nguyen et al., 2015).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

1. Ко-ферментация пищевых отходов с избыточным активным илом в периодическом режиме

Целью эксперимента было выявление наиболее эффективного инокулята для инициации процесса анаэробного сбраживания смеси пищевых отходов и избыточного активного ила со сниженной влажностью во флаконах объемом 0,5 л. В качестве инокулятов были исследованы: 1) уплотненный сброженный ОСВ, 2) прессованный сброженный ОСВ, 3) грунт полигона ТБО, а также смеси ОСВ и грунта ТБО. Высокая исходная концентрация ОВ ($71,2 \pm 1,5$ г ОВ/л), низкая влажность (92–93%) и низкое соотношение инокулята к субстрату ($15 \pm 5 / 85 \pm 5$ по ОВ) привели к резкому накоплению ЛЖК (9,8–14,0 г/л) и снижению pH до 5,4–6,0 во всех вариантах сбраживаемых смесей. Это привело к полной остановке метаногенеза, который не восстанавливался со временем. Около 39,8–48,9% ОВ сбраживаемых смесей разложилось до летучих компонентов (ЛЖК, спирты, CO_2 , H_2).

Восстановление метаногенеза в исследуемых образцах было достигнуто после частичного отъема сбраживаемой массы (снижение концентрации сухого вещества на $15,8 \pm 0,8\%$ от исходного), увеличения доли инокулята до 30–40% в расчете на суммарное ОВ смеси и химического подщелачивания с помощью раствора 1н NaOH. Влажность сбраживаемой смеси при этом повысилась до 93,5–94,0%.

После стабилизации процесса метаногенеза накопленные на кислотогенной стадии ЛЖК были преобразованы в метан (рис.1). Максимальные скорости образования метана наблюдали при использовании в качестве инокулятов смеси прессованного сброженного ОСВ с активированной суспензией грунта полигона ТБО ($4,77 \pm 0,24$ мм CH_4 /(г ОВ сут)) и смеси уплотненного сброженного ОСВ с активированной суспензией грунта полигона ТБО ($4,08 \pm 0,20$ мм CH_4 /(г ОВ сут)). Относительно высокая скорость метаногенеза ($3,57 \pm 0,18$ мм CH_4 /(г ОВ сут)) показана для смеси, инокулированной суспензией грунта полигона ТБО. При добавлении в качестве инокулятов уплотненного или прессованного сброженных ОСВ скорости метаногенеза составляли $0,53 \pm 0,03$ и $1,72 \pm 0,09$ мм CH_4 /(г ОВ сут), соответственно. Степень разложения ОВ в исследуемых смесях составила 75–85%, содержание метана в биогазе достигало 60–65%.

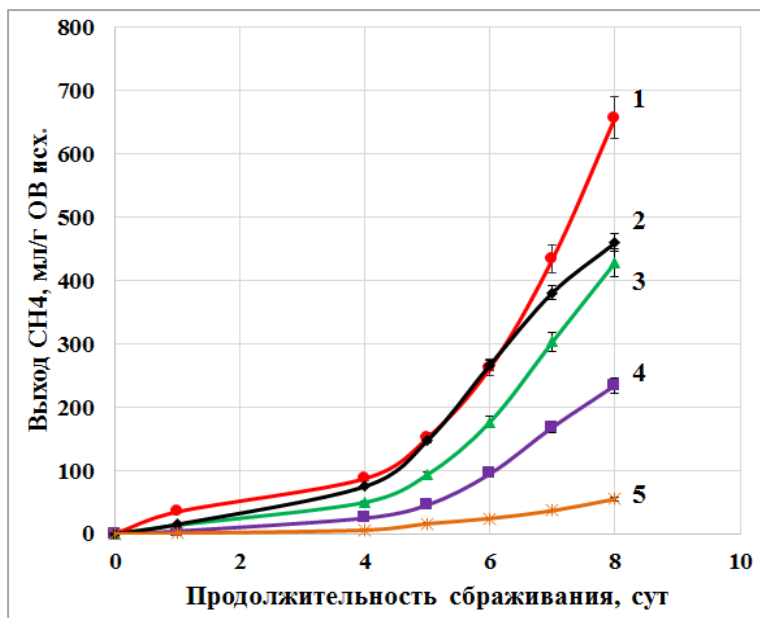


Рисунок 1. Динамика накопления метана (мл/г ОВ исх) в ходе термофильного сбраживания (50°C) смеси пищевых отходов и избыточного активного ила с использованием в качестве инокулята:

- (1) Грунт ТБО + Прессованный сброженный ОСВ,
- (2) Грунт ТБО + Уплотненный сброженный ОСВ,
- (3) Грунт ТБО,
- (4) Прессованный сброженный ОСВ,
- (5) Уплотненный сброженный ОСВ.

Таким образом, грунт полигона ТБО может служить доступным источником для получения активного инокулята для запуска процесса термофильного сбраживания смеси пищевых отходов и ОСВ.

2. Влияние полиакриламидного катионного флокулянта на процесс анаэробного сбраживания осадков сточных вод со сниженной влажностью

2.1 Влияние соотношения инокулята к субстрату на инициацию сбраживания осадков сточных вод со сниженной влажностью

Для определения оптимального соотношения инокулята к субстрату (И/С) для запуска процесса анаэробного сбраживания ОСВ со сниженной влажностью (92,5±0,5%) были проведены эксперименты с разными соотношениями И/С (табл. 1). В образцах с содержанием инокулята 40% по ОВ и менее образование метана прекратилось после 4 сут сбраживания в связи с накоплением большого количества ЛЖК – до 11,9 г/л и снижением рН. Процесс анаэробного сбраживания протекал стабильно в смесях с содержанием инокулята более 55% по ОВ, концентрация ЛЖК в которых не превышала 1,5–3,5 г/л. Максимальные скорости метаногенеза наблюдались в смесях с соотношением И/С 70/30, но суммарный выход метана был максимален в образцах с соотношением И/С 55/45. Это связано с содержанием в субстратной смеси большего количества разлагаемого ОВ, поступившего из модельного первичного осадка (на 7,5% больше).

Таблица 1. Характеристики процесса анаэробного сбраживания осадков сточных вод с влажностью 92,5% при разном исходном соотношении И/С в конце эксперимента (18 сут)

Соотношение И/С (по ОВ)	Максимальная скорость метаногенеза, мл/г ОВ исх	Выход СН ₄ , мл/г ОВ	Разложение ОВ, %	Концентрация ЛЖК, г/л экв. ацетата	рН
10/90	1,95±0,06	5,1±0,1	23,4	8,33±0,2	5,3
25/75	4,65±0,14	14,7±0,4	26,0	13,3±0,3	5,0
40/60	6,65±0,19	23,9±0,7	25,3	15,26±0,3	6,5
55/45	30,11±0,90	175,6±5,2	32,8	1,77±0,05	7,3
70/30	42,80±1,28	159,8±4,8	31,2	0,18±0,01	7,6
Контроль	18,79±0,56	80,6±2,4	32,6	0,15±0,01	7,5

Согласно полученным результатам, для запуска процесса анаэробного сбраживания ОСВ со сниженной влажностью (92–93%) во флаконах или лабораторных малоемких биореакторах необходимо, чтобы содержание инокулята в смеси составляло не менее 55% в расчете на суммарное ОВ смеси.

2.2 Определение токсичности полиакриламидного флокулянта и возможности его биодegradации в анаэробных условиях

Проверку биодegradабельности и токсичности полиакриламидного флокулянта (ПАА) проводили по методике Кампоса с соавт. (Campos et al., 2008). В среду с инокулятом (сброженный ОСВ) вносили ПАА в концентрации от 5 до 400 мг/г СВ в качестве единственного субстрата – серия Б (биодegradабельность) или вместе со смесью ЛЖК (ацетата – 60 мМ, пропионата – 10 мМ и бутирата – 30 мМ) – серия Т (токсичность).

Корреляция между увеличением количества флокулянта и концентрации аммонийного азота и ацетата в образцах свидетельствовала о частичном гидролизе ПАА.

Флокулянт в концентрации до 40 мг/г СВ не оказывал существенного ингибирующего действия на процесс сбраживания ЛЖК. Суммарный выход метана в образцах с добавлением ПАА в концентрации 5 и 40 мг/г СВ был выше на 8,8% и на 6,6% по сравнению с контролем без ПАА, соответственно. Это свидетельствует о том, что наличие ЛЖК в качестве субстратов для роста микроорганизмов способствует разложению ПАА. Максимальные скорости метаногенеза в образцах, обработанных 5 мг ПАА/г СВ, и в контрольных образцах были равны, а в образцах, обработанных 40 мг ПАА/г СВ, скорость образования метана была всего на 6,3% ниже, чем в контроле. В образцах с добавлением флокулянта в концентрации 400 мг/г СВ наблюдали выраженный ингибирующий эффект – снижение начальной скорости метаногенеза на 76,5%. Однако конечный выход метана в этих образцах составил 86,3% от контрольного. Несмотря на выраженное ингибирующее действие, концентрация флокулянта 400 мг/г СВ не приводила к критической дестабилизации метаногенеза при использовании в качестве субстратов простых органических соединений (ЛЖК).

Накопления водорода не происходило, что свидетельствовало об отсутствии ингибирующего действия ПАА на гидрогенотрофных метаногенов. Скорость разложения ацетата и бутирата снижались при концентрации флокулянта более 80 мг/г СВ, что свидетельствует о негативном воздействии ПАА на ацетат-использующих микроорганизмов и бутират-разлагающих синтрофов. Выраженное ингибирование активности пропионат-разлагающих синтрофных бактерий наблюдалось при концентрации флокулянта выше 5 мг/г СВ: к концу эксперимента в образцах, обработанных флокулянтом в концентрации 200 мг/г СВ было потреблено до 51,7% пропионата, а в образцах с концентрацией 400 мг/г СВ разложение пропионата не происходило. Таким образом, ПАА оказывает негативное воздействие на пропионат-окисляющих синтрофных бактерий даже в минимальной исследованной концентрации, что может приводить к накоплению пропионата в сбраживаемой смеси и ингибированию процесса разложения отходов, обработанных флокулянтом.

2.3 Влияние концентрации флокулянта на анаэробное сбраживание смеси осадков сточных вод при оптимальном соотношении инокулята к субстрату (55/45)

Применение флокулянтов на основе ПАА в процессе очистки сточных вод в последнее время активно расширяется. Обработанные флокулянтосодержащими осадки подвергаются стандартной переработке. При этом влияние полиакриламидных флокулянтов на процесс термофильного анаэробного сбраживания ОСВ и других органических отходов при сниженной влажности и высокой нагрузке ранее не изучалось. Мы исследовали влияние обработки ОСВ различными концентрациями ПАА (5–40 мг/г СВ) на процесс термофильного анаэробного сбраживания. Процесс сбраживания в целом был стабилен: накопления водорода не происходило, концентрация ЛЖК не превышала 0,35 г/л (максимальная на 3–4 сут) и значение pH во всех образцах составляло 7,3–7,5.

Таблица 2. Характеристики процесса анаэробного сбраживания смеси ОСВ (избыточный активный ил и модельный первичный осадок), обработанных различными концентрациями флокулянта, в конце эксперимента (29 сут) при соотношении количества инокулята к субстрату 55/45.

Концентрация ПАА, мг/г СВ	Выход CH ₄ , мл/г ОВ	Разложение ОВ, %	Концентрация ЛЖК, г/л экв. ацетата	Общий аммонийный азот, мг/л
0 (контроль)	192,6±5,7	34,3	0,12±0,01	650±19
5	187,8±5,6	29,9	0,15±0,01	1220±36
15	191,1±5,7	29,5	0,21±0,01	1423±42
30	174,3±5,2	31,5	0,19±0,01	970±29
40	150,8±4,5	36,0	0,20±0,01	1060±31

Обработка флокулянтосодержащими приводит к снижению начальной скорости метаногенеза (рис. 2). При продолжительности сбраживания более 13 сут обработка ОСВ флокулянтосодержащими в концентрации до 15 мг/г СВ не оказывала существенного влияния на конечный выход метана. При обработке ОСВ концентрацией флокулянта 40 мг/г СВ наблюдали снижение выхода метана на 21,7% по сравнению с контролем (табл. 2, рис. 2).

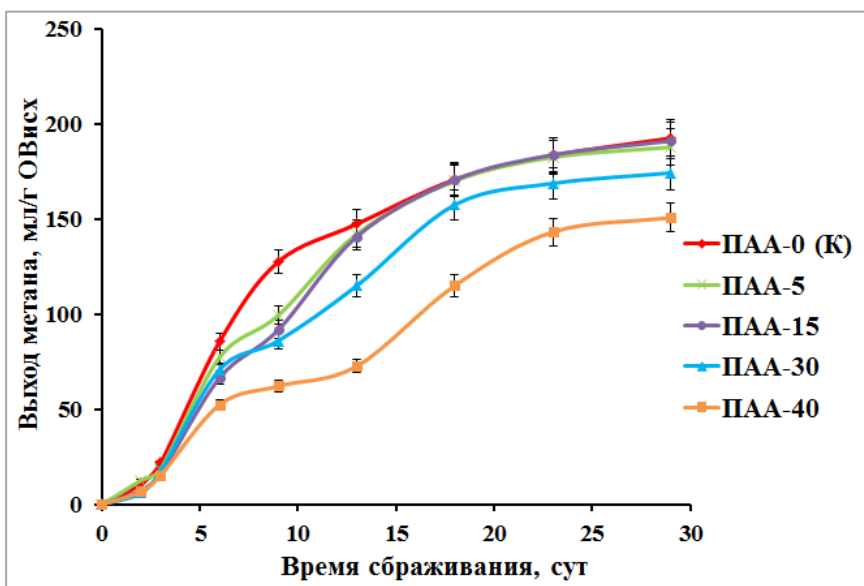


Рисунок 2. Динамика накопления метана при сбраживании смеси ОСВ (избыточный активный ил и модельный первичный осадок), обработанных различными концентрациями флокулянта (5–40 мг/г сухого вещества), при соотношении И/С 55/45.

Через 10–15 сут наблюдали частичное разрушение флоккул, образовавшихся при обработке смеси ОСВ флокулянтom, за которым последовала вторая фаза образования метана (рис. 2). Полученные результаты свидетельствуют о том, что снижение исходной скорости метаногенеза связано с формированием флоккул, структура которых, вероятнее всего, способствует снижению эффективности массопереноса и затруднению гидролиза. Выводы подтверждаются снижением концентраций аммонийного азота в образцах ПАА–30 и ПАА–40 (рис. 2, табл. 2).

2.4 Влияние концентрации флокулянта на анаэробное сбраживание смеси осадков сточных вод при сниженном соотношении инокулята к субстрату (40/60).

На практике возможны ситуации, которые могут привести к дестабилизации термофильного сбраживания, например, резкое снижение температуры или скачок нагрузки по субстрату. Для изучения влияния обработки ОСВ полиакриламидным флокулянтom на процесс анаэробного сбраживания в условиях дестабилизации был проведен эксперимент со сниженным соотношением И/С (40/60). При увеличении доли субстрата в смеси с инокулятом термофильный процесс характеризовался низкой метаногенной активностью и нестабильностью. Начальная скорость метаногенеза снижалась на 12,3–37,4% в зависимости от концентрации флокулянта (5–40 мг/г СВ). Деструкция ОВ заканчивалась на кислотогенной стадии. Накопление высоких суммарных концентраций ЛЖК (до 15,4–17,1 г/л), молекулярного водорода (до 5–7%) и снижение рН до 5,5–6,5 привело к дестабилизации процесса сбраживания и остановке метаногенеза (табл. 3, рис. 3).

Неожиданным было спонтанное восстановление метаногенеза в образцах, обработанных концентрацией флокулянта 40 мг/г СВ, через 11 сут (рис. 3). Образовавшиеся ЛЖК были полностью потреблены к концу эксперимента, что привело к повышению рН до 6,9 (табл. 3).

Таблица 3. Характеристики процесса анаэробного сбраживания смеси ОСВ (избыточный активный ил и модельный первичный осадок), обработанных различными концентрациями флокулянта, в конце эксперимента (после 29 сут сбраживания) при сниженном соотношении И/С 40/60.

Концентрация ПАА, мг/г СВ	Выход СН ₄ , мл/г ОВ	Разложение ОВ, %	Концентрация ЛЖК, г/л экв. ацетата	Общий аммонийный азот, мг/л	рН
0 (контроль)	25,1±0,7	31,2	15,26±0,45	2115	6,5
5	25,5±0,7	30,6	14,17±0,42	1941	5,5
15	28,2±0,8	36,9	13,36±0,40	1039	5,5
30	28,7±0,8	32,1	14,16±0,42	1051	5,5
40	105,3±3,1	37,5	0,33±0,01	1412	6,9

Принудительная агрегация биомассы в крупные флоккулы (2–3 мм в диаметре) в результате обработки флокулянтom привела к ухудшению массопереноса и формированию физического барьера и градиента таких метаболитов, как ЛЖК и аммоний. Поэтому, несмотря на высокую концентрацию ЛЖК в жидкой фазе и внешнем слое флоккул, во внутренних слоях флоккул сохранились условия, благоприятные для микроорганизмов метаногенного сообщества.

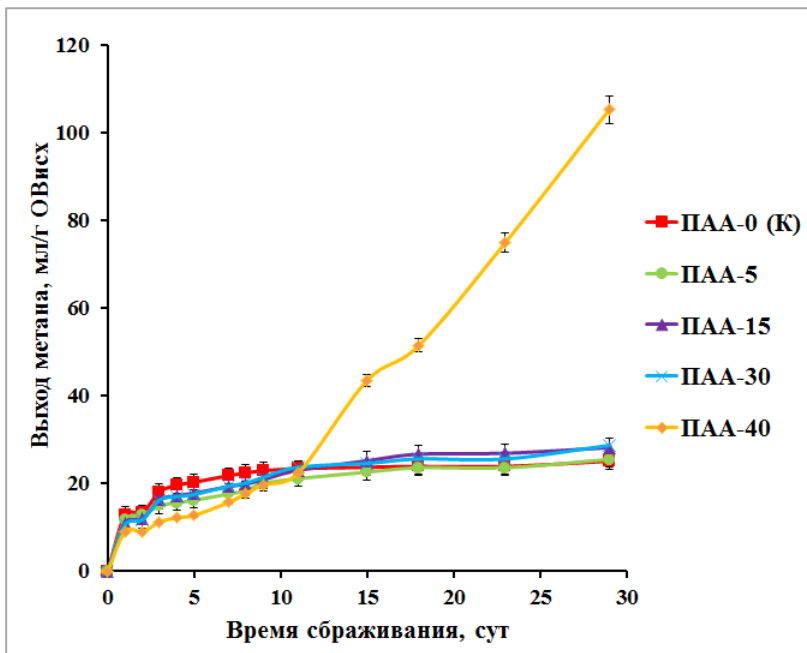


Рисунок 3. Динамика накопления метана при сбраживании смеси ОСВ (избыточный активный ил и модельный первичный осадок), обработанных различными концентрациями флокулянта (5–40 мг/г сухого вещества), при сниженном соотношении И/С 40/60

Размер и морфология флоккул напрямую зависели от концентрации флокулянта: чем выше концентрация, тем крупнее и плотнее флоккулы. При низких (до 15 мг/г СВ) концентрациях ПАА флоккулы имели округлую форму, в то время как при более высоких концентрациях (30 и 40 мг/г СВ) – линзовидную или зерновидную, часто окружены более рыхлым слоем. Часть субстрата, находящаяся внутри флоккул, оказалась недоступна для микроорганизмов, что приводило к снижению образования продуктов гидролиза. Полученные результаты позволили сформировать гипотезу о том, что флокулянты на основе ПАА могут быть использованы для восстановления метаногенеза в биореакторах, дестабилизированных вследствие избыточного накопления ЛЖК.

2.5 Использование полиакриламидного флокулянта для восстановления метаногенеза в дестабилизированных биореакторах

Гипотезу проверяли в эксперименте по сбраживанию смесей с соотношением И/С 30/70 и увеличенным количеством (45%) модельного первичного осадка в субстратной смеси. Концентрация ОВ составляла 40 г/кг сбраживаемой смеси при влажности $91,8 \pm 0,1\%$. Полное прекращение метаногенеза, вызванное накоплением ЛЖК ($3,42 \pm 0,05$ г/л) и водорода ($17,2 \pm 4,7\%$), и снижением рН ($5,8 \pm 0,3$), произошло на 5–6 сут эксперимента. Внесение раствора флокулянта на 7 сут эксперимента привело к увеличению влажности смеси до $93,9 \pm 0,1\%$. Затем экспериментальные смеси разделили на 2 группы и продолжили сбраживание: 1) без перемешивания, 2) при перемешивании с интенсивностью 100 об/мин.

Положительная динамика накопления метана и потребления ЛЖК наблюдалась только в смесях без перемешивания (табл. 4). В смесях, обработанных флокулянтом в концентрации 20 мг/г СВ, восстановление процесса метаногенеза началось через 4–5 сут. Незначительные положительные изменения начались в смесях ПАА–40 спустя 8 сут после обработки флокулянтом, однако существенный сдвиг отмечали только после 45 сут.

Таблица 4. Характеристики процесса анаэробного сбраживания с использованием полиакриламидного флокулянта для восстановления процесса метаногенеза (окончание эксперимента, смеси без перемешивания)

Образцы	Концентрация ЛЖК, г/л	Концентрация аммония, мг/л	pH	Выход метана, мл/г ОВ исх	Степень разложения ОВ, %
Контроль	11,75±0,58	822,1±41,1	5,68	11,16±0,55	35,0±1,7
ПАА-20	0,73±0,03	1047,2±52,3	7,60	189,84±9,54	60,4±3,0
ПАА-40	8,37±0,41	1033,0±51,6	6,89	53,41±2,67	52,6±2,6
ПАА-60	13,09±0,65	836,5±41,8	5,96	12,45±0,62	52,1±2,6

В смесях, сбраживаемых при перемешивании, происходило быстрое разрушение образовавшихся флоккул, что приводило к дальнейшему накоплению водорода до 9,7–11,9% и ЛЖК до 9,54±0,15 г/л независимо от концентрации флокулянта.

Критическое значение для восстановления процесса метаногенеза имели размеры и продолжительность существования образующихся флоккул. Для получения крупных флоккул ПАА необходимо вносить в виде 1,0–1,3% водного раствора. Снижение pH при накоплении избыточного количества ЛЖК не оказывало влияния по процессу флокуляции.

Таким образом, концентрация флокулянта, необходимая для восстановления метаногенеза, составляет от 20 до 40 мг/г СВ. При использовании флокулянта для восстановления метаногенеза следует полностью прекратить или снизить до возможного минимума перемешивание сбраживаемой смеси, чтобы увеличить продолжительность существования флоккул и избежать их преждевременной дезинтеграции.

3. Анаэробная переработка органических отходов при сниженной влажности и повышенной нагрузке в биогазовом реакторе

3.1 Запуск биогазового реактора и вывод на рабочий режим

Для отработки стратегии запуска процесса совместного сбраживания ОСВ и пищевых отходов или органической фракции ТБО при низкой влажности и увеличивающейся нагрузке был сконструирован лабораторный биогазовый реактор с непрерывным режимом сбраживания. Стратегия адаптации инокулята и постепенного увеличения нагрузки по субстрату была эффективной для запуска процесса сбраживания смеси ОСВ и пищевых отходов и позволила вывести биореактор на рабочий режим (выход биогаза более 1,2 м³/(м³ сут) за 12 сут. Использование стратегии постепенного увеличения нагрузки позволило добиться стабильности процесса сбраживания при низкой влажности смеси (до 91,3%) и высокой нагрузке по субстрату (до 6,31 кг ОВ/(м³ сут)) (табл. 5). При соотношении пищевых отходов и ОСВ в смеси 55/45 по ОВ, времени удержания 10 сут и нагрузке по субстрату 5,37 кг ОВ/(м³ сут) средний выход метана составлял 0,352 м³/(кг ОВ_{исх} сут) с содержанием метана 65–70% (табл. 5). При дальнейшем увеличении количества пищевых отходов в субстратной смеси до 70% по ОВ наблюдалось увеличение объемного выхода биогаза пропорционально нагрузке. При этом происходило снижение содержания метана в биогазе на 5–10% и снижение степени разложения ОВ субстрата, что свидетельствует о необходимости более длительной адаптации метаногенного сообщества к увеличению нагрузки.

Таблица 5. Характеристика процесса совместного сбраживания пищевых отходов и осадков сточных вод при различных соотношениях субстратов в сбраживаемой смеси.

Показатель	Доля пищевых отходов в смеси, % по весу (по ОВ)			
	0 (0)	20 (40)	30 (55)	40 (70)
Средняя влажность исходной смеси, %	95,5	93,4	92,4	91,3
Нагрузка по ОВ, кг ОВ / (м ³ сут)	2,92	4,54	5,37	6,31
Степень разложения ОВ, %	40–42	45–50	40–45	40–42
Содержание метана в биогазе, %	60–65	70–75	65–70	65–70
Средний выход биогаза, м ³ / (м ³ сут)	1,2	2,1	2,7	2,9
Средний выход метана, м ³ / кг ОВ	0,267	0,347	0,352	0,322

3.2 Термофильная анаэробная ко-ферментация осадков сточных вод и модельной органической фракции твердых бытовых отходов

В экспериментах по термофильной ко-ферментации смеси ОСВ и модельной органической фракции ТБО изучали влияние соотношения субстратов в смеси и нагрузки по субстрату на стабильность и эффективность процесса анаэробной переработки отходов. Результаты экспериментов представлены в табл. 6.

Таблица 6. Параметры анаэробной термофильной ко-ферментации осадков сточных вод и модельной органической фракции твердых бытовых отходов

Соотношение ОСВ/ОФ-ТБО	Нагрузка, кг ОВ / (м ³ сут)	Разложение ОВ, %	Скорость образования биогаза, м ³ / (м ³ сут)	Содержание СН ₄ в биогазе, %	Выход СН ₄ , м ³ / (кг ОВ _{исх})	Выход СН ₄ , м ³ / (кг ОВ _{уд})	pH	Концентрация N–NH ₄ , г/л	Концентрация ЛЖК, г/л
100/0	3,19	50,1	1,43	62,7	0,28	0,56	7,40	0,62	0,04
75/25	3,49	54,3	1,67	67,5	0,32	0,59	7,43	1,17	0,10
	5,23	53,3	2,42	66,3	0,31	0,58	7,41	1,27	0,15
	6,97	53,1	3,25	63,7	0,30	0,56	7,35	1,30	0,59
50/50	3,78	61,1	1,88	68,5	0,34	0,56	7,40	0,77	0,29
	5,67	59,3	2,73	69,3	0,33	0,56	7,35	0,80	0,16
	7,56	56,9	3,64	69,6	0,34	0,59	7,29	0,97	0,43
25/75	4,08	67,2	2,09	64,0	0,33	0,49	7,31	0,79	0,39
	6,11	65,6	3,00	63,7	0,31	0,48	7,24	0,81	0,66
	8,15	65,8	3,79	62,5	0,29	0,44	7,16	0,79	0,76
0/100	4,37	69,0	2,22	60,3	0,31	0,44	7,20	0,37	1,14
	6,56	68,1	3,18	59,9	0,29	0,43	7,15	0,42	2,08
	8,74	67,7	4,12	54,7	0,26	0,38	7,11	0,38	2,61

Для термофильной ко-ферментации ОСВ и органической фракции ТБО соотношение 50/50 по ОВ является оптимальным с точки зрения эффективности и

стабильности процесса. При времени удержания 10 сут и нагрузке по субстрату 7,56 кг ОВ/(м³сут) скорость образования биогаза составляет 3,64 м³/(м³сут), содержание метана в биогазе 69,6%, а удельный выход биогаза и метана достигает 0,85 и 0,59 м³/кг ОВ_{уд}, соответственно. Степень разложения ОВ возрастала при увеличении доли органической фракции ТБО в смеси. При этом выход метана в расчете на удаленное ОВ субстрата снижался, что связано с повышением в составе субстрата доли углеводов, сбраживание которых приводит к более низкому соотношению СН₄:СО₂ в биогазе. Увеличение нагрузки приводило к снижению содержания метана в биогазе и эффективности разложения ОВ (табл. 6). Уровень рН сброженной биомассы составлял 7,1–7,4 для всех соотношений субстратов в смеси, что свидетельствовало о стабильности процесса. В отличие от сбраживания моно-субстратов, сбраживание смеси субстратов приводило к увеличению концентрации аммонийного азота, что свидетельствовало о стимулировании анаэробного разложения белков за счет более сбалансированного соотношения питательных веществ. Стабильность сбраживания при высоких нагрузках по субстрату и низкой влажности подтверждалась отсутствием избыточного накопления ЛЖК. Однако при сбраживании 100% ОФ-ТБО при максимальной нагрузке 8,7 кг ОВ/(м³сут) концентрация ЛЖК в сброженной массе возрастала до 2,61 г/л (табл. 6), что свидетельствовало о начале дестабилизации процесса.

Полученные результаты свидетельствуют о положительном влиянии ко-ферментации на процесс анаэробного сбраживания. Использование смеси субстратов позволяло достичь более сбалансированного состава питательных веществ и повышало адаптивность биореактора, что позволило увеличивать нагрузку без потери стабильности и эффективности анаэробного сбраживания.

4. Метаногенные консорциумы, устойчивые к высоким концентрациям летучих жирных кислот

4.1 Получение метаногенных консорциумов, устойчивых к высоким концентрациям летучих жирных кислот

Применение микробных консорциумов, адаптированных к тем или иным неблагоприятным условиям, считается перспективным методом для восстановления и интенсификации процесса сбраживания отходов. Внесение адаптированных консорциумов в дестабилизированный биореактор приводит не только к увеличению плотности ключевых групп микроорганизмов, участвующих в процессе разложения ОВ, но и изменениям физиологических связей между ними (Wang et al., 2009; Lins et al., 2014). Нами были получены микробные консорциумы, адаптированные к высоким концентрациям ЛЖК.

Термофильные синтрофные метаногенные консорциумы, устойчивые к высоким концентрациям бутирата, получали из сброженного осадка путем последовательного посева биомассы (10% посевного) в свежую среду с большей концентрацией субстрата: 20, 50, 95, 170 мМ бутирата. Полное разложение бутирата в концентрации 20 мМ (рис. 4А) происходило в течение 16 сут без лаг-фазы с максимальной скоростью 7,1 ммоль/(л сут) и сопровождалось быстрым накоплением ацетата (57±2 мМ). Резкое повышение концентрации ацетата было неблагоприятным для ацетокластических метаногенов рода *Methanothrix*, доминировавших в инокуляте. После длительной задержки (2 мес.) произошло увеличение плотности

Methanosarcina-подобных клеток, что способствовало преобразованию ацетата в метан.

Скорости разложения бутирата и накопления ацетата после пересева накопительной культуры на среду, содержащую 50 мМ бутирата, были ниже, чем в предыдущем эксперименте (1,6 и 3,6 ммоль/(л сут)), однако процессы разложения бутирата и образования метана были более сбалансированы (рис. 4Б).

Наиболее эффективно разложение бутирата происходило при исходной концентрации 95 мМ, что указывало на адаптацию сообщества бутират-разлагающих синтрофных бактерий и метаногенов к условиям культивирования (рис. 4В). Бутират разлагался полностью за 23 сут с максимальной скоростью 10,3 ммоль/(лсут). Максимальная скорость метаногенеза составляла 21,2 ммоль/(л сут).

При дальнейшем увеличении концентрации субстрата до 170 мМ, лимитирующей стадией процесса становилась стадия разложения ацетата (рис. 4Г). Бутират разлагался с максимальной скоростью 7,5 ммоль/(л сут). Образование метана происходило с максимальной скоростью 11,6 ммоль/(л сут). Максимальная концентрация ацетата достигала 198,8 мМ, что оказывало существенное ингибирующее воздействие на микроорганизмы метаногенного сообщества.

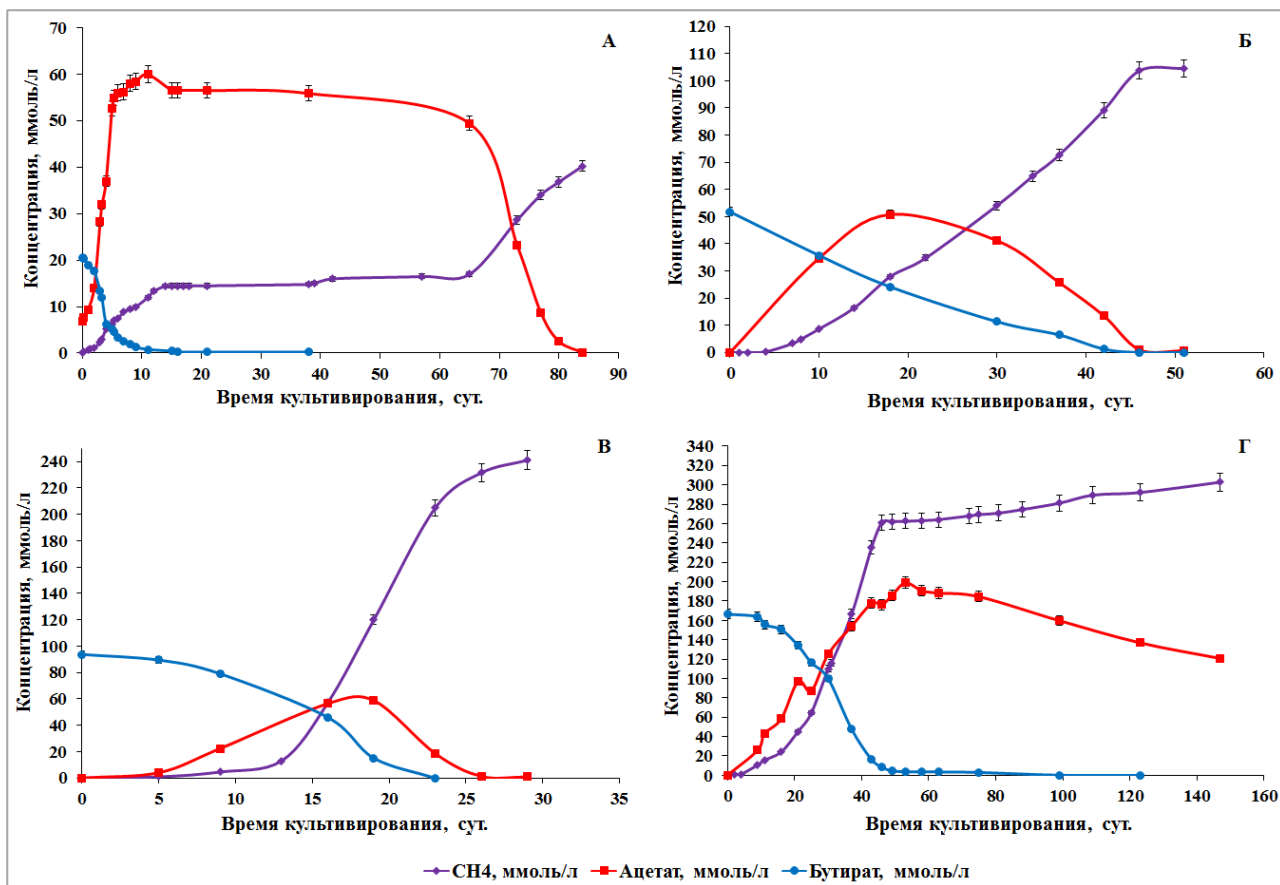


Рисунок 4. Разложение бутирата в зависимости от исходной концентрации субстрата: А) 20 мМ, Б) 50мМ, В) 95 мМ, Г) 170 мМ.

Таким образом, для эффективного синтрофного разложения бутирата в высоких концентрациях необходимо присутствие популяции активных ацетат-использующих микроорганизмов.

Термофильные метаногенные консорциумы, устойчивые к высоким концентрациям пропионата, получали путем последовательного пересева на среду с возрастающей концентрацией субстрата: 23, 60 и 95 мМ. Разложение пропионата при начальной концентрации 23 мМ проходило без фазы задержки в течение 21 сут (рис. 5А). Максимальная скорость разложения пропионата составляла 2,0 ммоль/(л сут). Более медленная скорость накопления и меньшая концентрация ацетата, образующегося в результате синтрофной деградации пропионата, способствовала постепенной адаптации ацетокластических метаногенов и накоплению микроорганизмов, морфологически сходных с представителями рода *Methanothrix*. Дестабилизацию процесса разложения пропионата, произошедшую после увеличения концентрации субстрата до 60 мМ, удалось преодолеть путем повышения температуры инкубации до 55°C (рис. 5Б). Увеличение популяции *Methanosarcina*-подобных клеток и формирование крупных агрегатов способствовало активному потреблению ацетата с максимальной скоростью 10,9 ммоль/(л сут). Дальнейшее увеличение концентрации пропионата до 95 мМ способствовало значительному снижению эффективности его разложения (рис.5В).

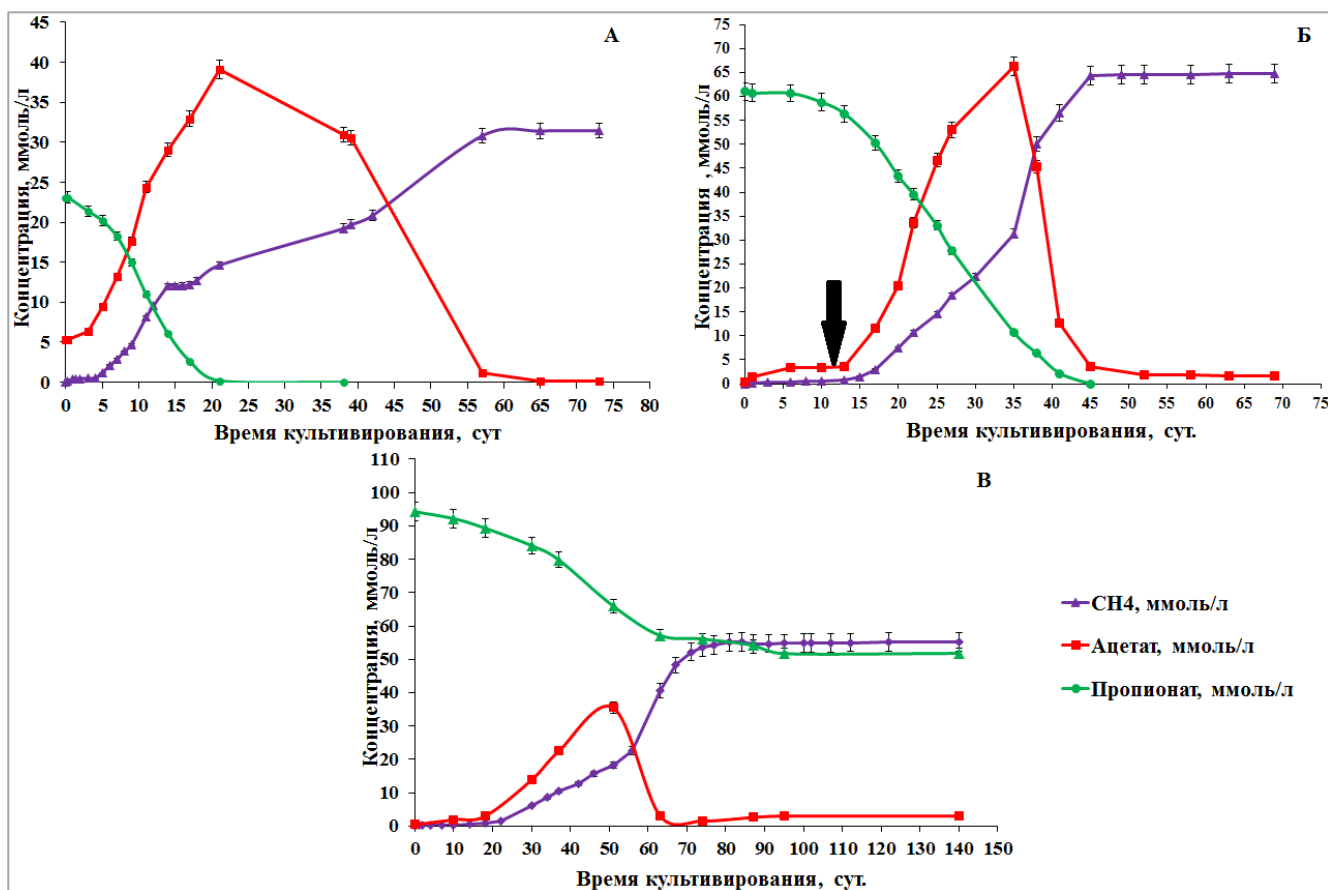


Рисунок 5. Разложение пропионата: А – концентрация 23 мМ, температура 50°C, Б – концентрация 60 мМ, температура 50–55°C, В – концентрация 95 мМ, температура 55°C. Стрелкой обозначен момент смены температуры с 50°C на 55°C.

Ацетат и водород, образовавшиеся в результате активности пропионат-окисляющих синтрофных бактерий, были полностью потреблены, что свидетельствовало об активности ацетокластических и гидрогенотрофных метаногенов в сообществе. После 2 мес. инкубации наблюдали постепенное

защелачивание среды до pH 9,0–9,5, что могло быть причиной ингибирования активности пропионат-использующих синтрофных бактерий.

4.2 Проверка активности метаногенных консорциумов, адаптированных к высоким концентрациям летучих жирных кислот

Активность полученных метаногенных консорциумов, адаптированных к высоким концентрациям ЛЖК, проверяли в эксперименте по сбраживанию модельной органической фракции ТБО при различных исходных соотношениях инокулята к субстрату (И/С). Внесение метаногенных консорциумов в качестве дополнительного инокулята (в контрольные смеси вносили тот же объем воды) способствовало существенному повышению эффективности процесса сбраживания. При добавлении консорциума в смеси с соотношением И/С 50/50 процесс развивался стабильно со средней скоростью $0,232 \pm 0,005$ ммоль CH_4 /(г $\text{OB}_{\text{исх}}$ сут), что в 3,5 раза выше, чем в контрольных смесях ($0,067 \pm 0,001$ ммоль CH_4 /(г $\text{OB}_{\text{исх}}$ сут)). Эффективность удаления органического вещества субстрата в образцах с добавлением консорциумов была в 2,9 раза выше, чем в контрольных смесях. Добавление консорциумов к основному инокуляту способствовало стабильному развитию анаэробного процесса в смесях с соотношением И/С 20/80, однако наблюдалось наличие лаг-фазы продолжительностью 3–5 сут, после которой образование метана проходило со средней скоростью $0,228 \pm 0,005$ ммоль CH_4 /(г $\text{OB}_{\text{исх}}$ сут). В контрольных смесях с соотношением И/С 20/80 образованием метана полностью прекратилось на 3–5 сут инкубации. Эффективность разложения OB в смесях без добавления консорциумов была в 7,3 раза ниже, чем в смесях с консорциумами. Максимальную концентрацию ЛЖК наблюдали на 2–3 сут в образцах с добавлением консорциумов (6,8–7,1 г/л), что в 1,5–2 раза больше, чем в контрольных смесях. Таким образом, полученные адаптированные консорциумы проявили высокую активность при использовании в качестве дополнительного инокулята для интенсификации и повышения стабильности процесса сбраживания. Отсутствие ингибирования микробного сообщества промежуточными продуктами способствовало более глубокому разложению субстрата.

4.3 Изменения в составе сообщества, устойчивого к концентрации бутирата 170 мМ

Образцы биомассы метаногенного сообщества, устойчивого к высоким концентрациям бутирата, были отобраны для молекулярно-биологического анализа (клонирование гена 16S рРНК) через 20 сут после начала инкубации (начальная стадия разложения бутирата с исходной концентрацией 170 мМ) и через 120 сут (стадия разложения ацетата). В начале эксперимента в бактериальном сообществе детектировались микроорганизмы, родственные *Syntrophomonas wolfei* subsp. *saponavida*, способным синтрофно разлагать бутират. Порядка 30% клонированных последовательностей принадлежало бактериям, родственным представителям вида *Syntrophaceticus schinkii* Sp3 (96,4% сходства), для которого показана способность к синтрофному окислению ацетата. В качестве минорного компонента выявлены последовательности, принадлежащие микроорганизмам, родственным другим ацетат-окисляющим синтрофным бактериям: *Thermacetogenium phaeum* DSM 12270 (97,1% сходства) – 5,3% последовательностей, *Pseudothermotoga profunda* AZM34c06 (97,4%

сходства) – 1,3%, и *Tepidiphilus margaritifer* N2–214 (99,4% сходства) – 2,5%. Около 38% клонированных последовательностей принадлежали бактериям, родственным *Anaerobaculum hydrogeniformans* OS1 (100% сходства). *A. hydrogeniformans* является типичным представителем микробных сообществ термофильных биореакторов, активно ферментирует сахара, аминокислоты и дрожжевой экстракт с образованием водорода (Maune, Tanner, 2012). 15,2% последовательностей принадлежали представителям филума *Chloroflexi*, класса *Anaerolineae*, которые являются одной из наиболее многочисленных групп микроорганизмов, обитающих в анаэробных биореакторах, и часто включены в синтрофные анаэробные консорциумы (Jang et al., 2014). Доминирующим видом метаногенных архей был *Methanosarcina thermophila* TM–1 (100% сходства) – 86% последовательностей. В качестве минорной группы ацетокластических метаногенов детектировались микроорганизмы, родственные *Methanotherix thermophila* PT (95,8% сходства) – 4,3% последовательностей. Гидрогенотрофные метаногены были представлены *Methanothermobacter thermautotrophicus* Delta H (100% сходства) – 3,2% последовательностей. В сообществе также обнаружены последовательности, принадлежащие микроорганизмам, родственным *Methanomassiliicoccus luminyensis* B10 (95,7%), облигатно зависимым от водорода метилотрофным метаногенам.

К концу эксперимента произошла смена состава сообщества. Доминирующей группой стали микроорганизмы, родственные бактериям, осуществляющим синтрофное окисление ацетата: *S. schinkii* Sp3 – 42,9% и *T. phaeum* DSM 12270 – 7,1% последовательностей. Более 26% последовательностей приходилось на представителей группы неклассифицированных *Firmicutes*, среди которых распространены синтрофные бактерии. Представленность бактерий, родственных *A. hydrogeniformans* и *Chloroflexi*, снизилась до 14,3 и 7,1% от общего количества бактериальных последовательностей. В архейной популяции также произошли существенные изменения: количество последовательностей метаногенов, родственных *Methanosarcina thermophila*, снизилось до 25%, при этом количество последовательностей *M. thermautotrophicus* Delta H возросло до 53,1%, а *M. luminyensis* – до 21,9%. Полученные результаты свидетельствуют о смене основного пути образования метана с ацетокластического на гидрогенотрофный, сопряженный с синтрофным окислением ацетата, при накоплении высоких концентраций ацетата в среде.

5 Выделение и описание термофильной бактерии ‘*Thermosaenobacter saccharolyticus*’

Из синтрофного метаногенного консорциума, устойчивого к концентрации бутирата 170 мМ, была выделена чистая культура термофильной бактерии, получившая рабочее название штамм SP2. Клетки штамма SP2 представляют собой грамположительные палочки длиной от 2 до 10 мкм, диаметром около 0,5 мкм. Клетки одиночные, в парах, иногда в коротких цепочках, подвижны за счет одного или нескольких латеральных жгутиков (рис. 6). Образует споры. Штамм SP2 является облигатным анаэробом, умеренным термофилом с ростом в диапазоне от 20 до 70°C с оптимумом при 55–60°C, нейтрофилом с ростом при pH от 3,5 до 8 и оптимумом при 7,5. Рост штамма SP2 наблюдается в диапазоне концентраций NaCl от 0 до 2,5% с максимальной скоростью в отсутствии соли.

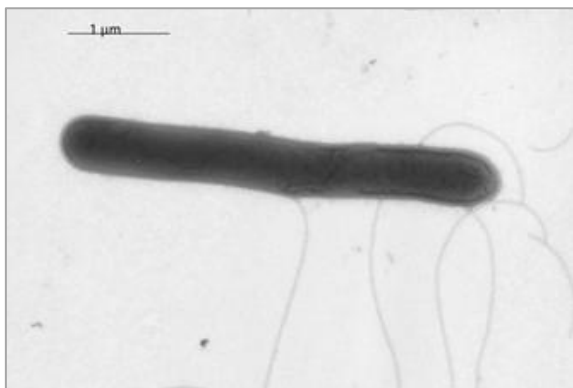


Рисунок 6. Микрофотография клеток штамма SP2 со жгутиками. Просвечивающая электронная микроскопия. Масштаб – 1 мкм.

В качестве субстратов для роста в чистой культуре штамм SP2 использует целлобиозу, фруктозу, маннозу, галактозу, дрожжевой экстракт, сахарозу и глюкозу. Слабый рост наблюдается на ксилозе, рамнозе, цистеине, казаминовых кислотах. Продуктами сбраживания глюкозы являются ацетат, этанол, H_2 и CO_2 . В качестве акцептора электронов штамм SP2 способен использовать тиосульфат (с образованием H_2S), при этом в клетках наблюдается отложение элементарной серы в виде одной или нескольких глобул. Штамм SP2 способен к синтрофному росту при культивировании с гидрогенотрофным метаногеном *M. thermoautotrophicus* на среде с глицерином и лактатом (рис. 7).

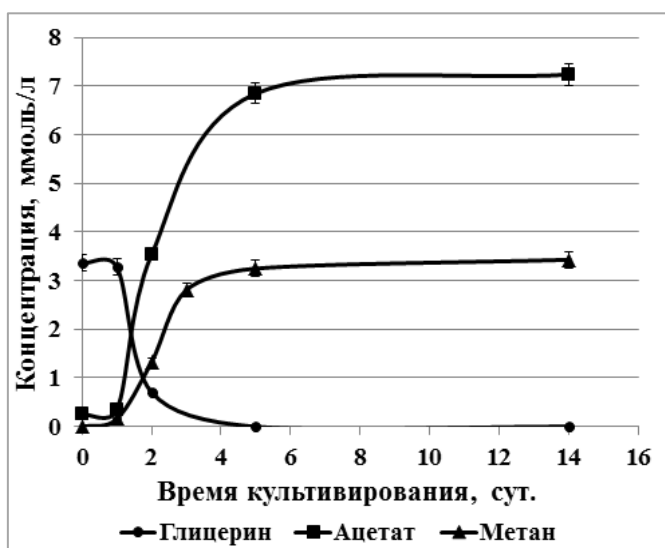


Рисунок 7. Динамика синтрофного разложения глицерина при культивировании штамма SP2 с гидрогенотрофным метаногеном.

Анализ гена 16S рРНК показал, что выделенная бактерия относится к классу *Clostridia*, семейству *Thermoanaerobacteraceae*. Ближайшими филогенетическими родственниками являются *Theridanaerobacter acetatoxydans* (93% сходства гена 16S рРНК) и *T. syntrophicus* (92,8%). Анализ генома показал, что содержание Г+Ц составляет 43,1%. На основе сравнения последовательностей гена 16S рРНК была построена филогенетическая дендрограмма (рис. 8). На основании результатов филогенетического анализа и сравнения морфологических, физиологических и других дифференцирующих признаков с наиболее близкородственными видами, установили, что выделенная бактерия является представителем нового вида нового рода, для которого предложено название '*Thermocaenobacter saccharolyticus*'. Штамм SP2 принят в коллекцию DSMZ под номером DSM-107955.

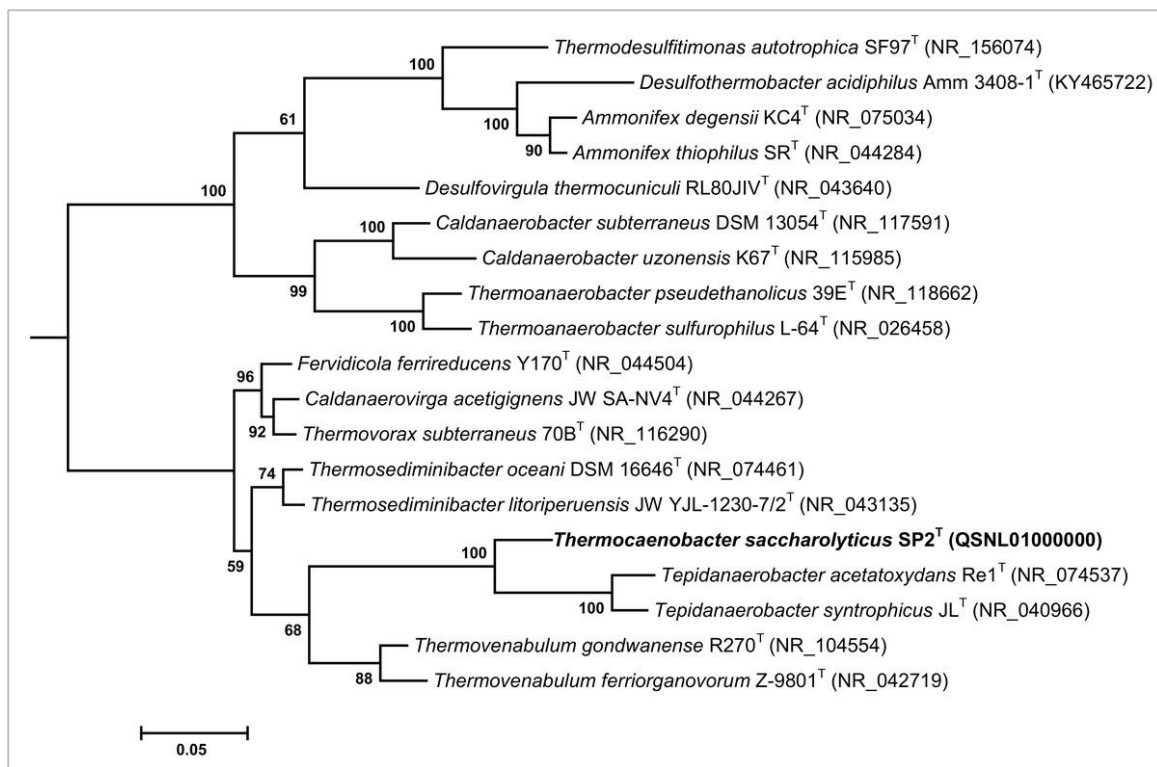


Рисунок 8. Филогенетическая дендрограмма, построенная на основе сравнения последовательностей гена 16S рРНК штамма SP2 (*Thermocaeenobacter saccharolyticus*) и некоторых родственных видов семейства *Thermoanaerobacteraceae*.

Характеристика ‘*Thermocaeenobacter*’ gen. nov. (ter.mo.cae.no.ba’cter. Gr.adj. *thermos* – горячий; L.n. *caenum* – грязь, сток; L. n. *bacter* – палочка; N. L. masc. n. *Thermocaeenobacter* – термофильная палочка, выделенная из сброженного осадка сточных вод). Род ‘*Thermocaeenobacter*’ относится к семейству *Thermoanaerobacteraceae* класса *Clostridia*. Грамположительные прямые палочки. Подвижны. Облигатные анаэробы. Умеренные термофилы, нейтрофилы. Хемоорганогетеротрофы. Основным источником энергии являются простые сахара. В качестве акцептора электронов используют тиосульфат. Место обитания: термофильные анаэробные биореакторы.

Характеристика ‘*Thermocaeenobacter saccharolyticus*’ sp. nov. (sa.cha.ro.ly’ti.cus. Gr.N. *sakkharos* – сахар; Gr. adj. *lytikos* – способный растворять; N. L. masc. adj. *saccharolyticus* – использующий (растворяющий) сахара). Клетки штамма SP2 представляют собой палочки длиной от 2 до 10 мкм, диаметром около 0,5 мкм. Подвижны за счет латеральных жгутиков. Образуют терминальные споры. Облигатный анаэроб. Умеренный термофил с ростом в диапазоне от 20 до 70°C с оптимумом при 55-60°C. Нейтрофил с ростом при pH от 3,5 до 8 с оптимумом при pH 7,5. Не нуждается в присутствии NaCl в среде, рост наблюдается при концентрации NaCl до 2,5%. Использует сахарозу, глюкозу, фруктозу и другие сахара в качестве субстратов для роста. Нуждается в присутствии дрожжевого экстракта в среде. В качестве акцепторов электронов использует тиосульфат с образованием внутри клеток глобул элементарной серы. При культивировании с гидрогенотрофным метаногеном способен синтрофно разлагать лактат и глицерин. Штамм SP2 выделен из метаногенного консорциума, устойчивого к концентрации бутирата 170 мМ, полученного из сброженного осадка сточных вод.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате экспериментов во флаконах и в лабораторном биогазовом реакторе показано, что ко-ферментация ОСВ с пищевыми отходами или органической фракцией ТБО позволяет существенно увеличить скорость образования и выход биогаза. Оптимальным соотношением ОСВ и пищевых отходов или органической фракции ТБО в смеси для ко-ферментации является соотношение 50/50 в расчете на общее органическое вещество смеси.

Добавление суспензии грунта полигона ТБО обеспечивало более высокую скорость образования и выход метана и более эффективное удаление ЛЖК, что свидетельствует о том, что грунт полигона ТБО обогащен метаногенными археями и синтрофными бактериями. Повсеместная доступность грунта полигонов ТБО на территории России делает его привлекательным потенциальным источником анаэробных микроорганизмов для инокуляции новых биореакторов. Недостатком такого инокулята является необходимость предварительной подготовки и активации. Сброженный ОСВ является универсальным и эффективным инокулятом для инициации анаэробного сбраживания отходов, однако его доступность на территории России ограничена. На лабораторном биогазовом реакторе была отработана стратегия постепенного увеличения нагрузки по субстрату для запуска реактора, что позволило микробному сообществу адаптироваться и способствовало стабильной работе реактора при высокой нагрузке (до 8,74 кг ОВ/(м³ сут)) и низкой влажности (до 90%). Параметры процесса сбраживания, полученные в работе, соответствуют лучшим мировым показателям для лабораторных и промышленных реакторов.

К началу работы в литературе отсутствовали данные о влиянии полиакриламидных флокулянтов на процесс термофильного анаэробного сбраживания. Нами показано, что обработка ОСВ флокулянтом снижает начальные скорости образования метана за счет замедления гидролиза субстрата, нарушения массопереноса и ингибирования бактерий, синтрофно разлагающих пропионат. Впервые была показана возможность использования флокулянта для восстановления метаногенеза в реакторах, дестабилизированных вследствие накопления высоких концентраций ЛЖК. Принудительная агрегация биомассы способствует формированию градиента концентраций ЛЖК и других промежуточных продуктов разложения ОВ отходов, а также ограничивает доступность субстрата для более устойчивых к высоким концентрациям ЛЖК гидролитических бактерий, что способствует формированию внутри флоккул более благоприятных условий для синтрофных бактерий и метаногенов. Размеры и продолжительность существования образующихся флоккул имеют критическое значение для восстановления метаногенеза.

Показано, что при высокой нагрузке по ОВ использование химического подщелачивания не позволяет эффективно решить проблему дестабилизации вследствие избыточного накопления ЛЖК в среде. Использование высокоактивных метаногенных консорциумов, устойчивых к высоким концентрациям ЛЖК, позволило существенно увеличить скорость образования и выход метана и повысить стабильность процесса, в том числе при низком соотношении инокулята к субстрату. Разложение ацетата является ключевой стадией, лимитирующей процесс разложения ОВ при высоких нагрузках. При увеличении концентрации ацетата в термофильных условиях роль синтрофного пути его трансформации, сопряженного с

гидрогенотрофным метаногенезом, существенно возрастает, а вклад ацетокластического метаногенеза снижается. Разнообразие синтрофов, вовлеченных в разложение ОВ, не ограничивается только пропионат-, бутират- и ацетат-окисляющими бактериями. При разложении отходов в большом количестве выделяется лактат, при разложении отходов, богатых липидами, образуется глицерин. Выделенная в чистую культуру и описанная термофильная бактерия штамм SP2 способна к синтрофному росту на среде с глицерином и лактатом в присутствии метаногена *Methanothermobacter thermoautotrophicus*. Для выделенной бактерии предложено название '*Thermocaeobacter saccharolyticus*'.

ВЫВОДЫ

1) Показано, что грунт полигона твердых бытовых отходов после предварительной обработки и активации может быть использован в качестве доступного инокулята для инициации процесса анаэробного сбраживания органической фракции твердых бытовых отходов и пищевых отходов и осадков сточных вод в анаэробных реакторах.

2) В экспериментах во флаконах в периодическом режиме и в лабораторном биогазовом реакторе в непрерывном режиме было определено, что оптимальным соотношением субстратов (пищевые отходы или органическая фракция твердых бытовых отходов и осадки сточных вод) в сбраживаемой смеси в расчете на общее органическое вещество смеси является их использование в равных долях. Для запуска биореактора с высокой нагрузкой наиболее оптимальной является стратегия постепенной адаптации к увеличению нагрузки по субстрату, с использованием которой удалось добиться стабильной работы реактора при влажности сбраживаемой смеси около 91%.

3) Полиакриламидный катионный флокулянт Праэстол в концентрации от 5 до 40 мг/г сухого вещества приводит к снижению начальной скорости метаногенеза. Ингибирующее действие флокулянта связано с нарушением гидролиза органического вещества, ухудшением массопереноса и влиянием на пропионат-окисляющих синтрофных бактерий.

4) Показана возможность использования полиакриламидного катионного флокулянта в концентрации 20–40 мг/г сухого вещества для восстановления метаногенеза в дестабилизированных вследствие накопления высоких концентраций летучих жирных кислот биореакторах за счет формирования крупных флокул, внутри которых сохраняются условия, более благоприятные для жизнедеятельности синтрофных бактерий и метаногенных архей.

5) Получены метаногенные консорциумы, устойчивые к высоким концентрациям пропионата, бутирата и ацетата. Установлено, что при высоких нагрузках по летучим жирным кислотам лимитирующей стадией является разложение ацетата. Применение метаногенных консорциумов, адаптированных к высоким концентрациям летучих жирных кислот, в качестве дополнительного инокулята при сбраживании органических отходов с высокой нагрузкой по субстрату способствует увеличению скорости метаногенеза в 3,5 раза и более, эффективности разложения органического вещества в 2,9–7,3 раза и существенному повышению стабильности процесса сбраживания.

б) С помощью молекулярно-биологических методов был исследован состав микробного сообщества, устойчивого к концентрациям бутирата 170 мМ. При увеличении концентрации ацетата в среде происходит увеличение представленности гидрогенотрофных метаногенов (*Methanothermobacter thermoautotrophicus*) и синтрофных ацетат-окисляющих бактерий (*Syntrophaceticus schinkii*, *Thermacetogenium phaeum* и др.), что свидетельствует о смене ключевого пути метаногенеза с ацетокластического на гидрогенотрофный, сопряженный с синтрофным окислением ацетата.

7) Выделена в чистую культуру и описана новая термофильная бактерия штамм SP2, способная к синтрофному росту на среде с глицерином и лактатом в присутствии гидрогенотрофного метаногена. Установлено, что выделенная бактерия относится к новому виду нового рода, для которого предложено название '*Thermocaenobacter saccharolyticus*'.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Экспериментальные статьи

Статьи в журналах, рекомендованных ВАК:

1) Никитина А.А., Кевбрина М.В., Каллистова А.Ю., Некрасова В.К., Литти Ю.В., Ножевникова А.Н. Интенсификация микробного разложения органической фракции бытовых отходов: лабораторные и полевые эксперименты // Прикладная биохимия и микробиология. – 2015. – Т. 51. – № 4. – с. 377 – 386.

2) Litti Y., Nikitina A., Kovalev D., Ermoshin A., Mahajan R., Goel G., Nozhevnikova A. Influence of cationic polyacrylamide flocculant on high-solids anaerobic digestion of sewage sludge under thermophilic conditions // Environ Technol. – 2017. – doi: 10.1080/09593330.2017.1417492.

3) Ковалев Д.А., Ковалев А.А., Никитина А.А., Литти Ю.В., Ножевникова А.Н., Караева Ю.В. Применение повышенного давления в реакторном пространстве и кондуктивных материалов для интенсификации анаэробного сбраживания // Журнал «Труды Академэнерго». – 2018. – № 3. – с. 72–80.

Статьи в других научных изданиях:

1) Литти Ю.В., Ковалев Д.А., Ковалев А.А., Никитина А.А., Ермошин А.А., Ножевникова А.Н. Анаэробная обработка высокоуплотненных осадков сточных вод в термофильных условиях // Вода magazine. – 2015. – №6 (94). – с. 34 – 38.

2) Литти Ю.В., Ковалев Д.А., Ковалев А.А., Никитина А.А., Ермошин А.А., Ножевникова А.Н. Основы эффективной биотехнологии утилизации коммунальных отходов путем метаногенного сбраживания органической фракции ТБО совместно с ОСВ // Актуальная биотехнология. –2016. – №3(18). –с. 107–113.

Тезисы конференций

1) Никитина А.А., Каллистова А.Ю., Литти Ю.В., Некрасова В.К., Ножевникова А.Н. Термофильная анаэробная деградации органической фракции ТБО и выделение участвующих в процессе метаногенных архей // IX Молодежная школа – конференция с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии» – Москва, ИНМИ РАН, 21–23 сентября 2013 г, с. 41–43.

2) Никитина А.А., Некрасова В.К., Каллистова А.Ю., Литти Ю.В., Ножевникова А.Н. Анаэробная микробная деградации органической фракции твердых бытовых отходов и осадков сточных вод с получением метана // Московский международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития» – Москва, 2014, с. 432 – 433.

3) Nikitina A.A., Kallistova A.Yu., Nekrasova V.K., Litti Yu.V., Nozhevnikova A.N. Methane production from organic waste and thermophilic methanogenic archaea involved into the process // 10th International Congress on Extremophiles – St-Petersburg, 7–11 September 2014, P. 307.

4) Никитина А.А., Ножевникова А.Н. Разложение органических отходов с получением метана путем анаэробной микробной ферментации при разных температурах. // Международная

конференция по биоорганической химии, биотехнологии и бионанотехнологии, посвященной 55-летию ИБХ им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, и 80-летию со дня рождения академика Ю.А. Овчинникова – Москва, 2014, с. 62, 57.

5) Никитина А.А., Литти Ю.В. Анаэробная деградация высокоуплотненных осадков сточных вод с образованием метана в термофильных условиях // VIII Международный конгресс Биотехнологии: состояние и перспективы развития – Москва, 17–20 марта 2015, том 2, с. 374–375.

6) Никитина А.А., Литти Ю.В. Адаптация термофильных консорциумов синтрофных бактерий и метаногенных архей к высоким концентрациям бутирата // Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» – Москва, МГУ, 13 – 17 апреля 2015, с. 226.

7) Никитина А.А., Литти Ю.В. Способы восстановления метаногенеза при избыточном накоплении летучих жирных кислот // 19 Международная Пушкинская школа – конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века» – Пушкино, 20 – 24 апреля 2015 г., с. 189.

8) Литти Ю.В., Никитина А.А., Ковалев Д.А., Ковалев А.А., Ермошин А.А., Зубов М.Г., Ножевникова А.Н. Актуальные аспекты анаэробной обработки высокоуплотненных осадков сточных вод в термофильных условиях // Международная конференция Waste Tech–2015, Москва, 26–28 мая 2015 г.

9) Никитина А.А., Литти Ю.В. Влияние полиакриламидного катионного флокулянта на процесс анаэробного сбраживания осадков сточных вод // X международная школа – конференция с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии» – Москва, 27 – 30 октября 2015 г., с. 116–119.

10) Литти Ю.В., Никитина А.А., Бочкова Е.А., Ковалев Д.А., Зубов М.Г., Ножевникова А.Н. Разработка основ биотехнологии переработки коммунальных отходов путем метаногенного сбраживания органической фракции ТБО совместно с ОСВ // Ежегодная научная конференция ФИЦ Биотехнологии РАН – Москва, 23–25 мая 2016 г.

11) Никитина А.А. Исследование термофильных синтрофных метаногенных ассоциаций в процессе обработки органических отходов // Отчетная конференция аспирантов – ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 20 – 26 июня 2016 г.

12) Litti Yu.V., Nikitina A.A., Nozhevnikova A.N. Influence of cationic polyacrylamide flocculant on high-solids anaerobic digestion of sewage sludge under thermophilic condition // XII Latin American Symposium and Workshop on anaerobic digestion – Cusco, Peru, October 23–27, 2016.

13) Никитина А.А., Литти Ю.В., Ножевникова А.Н. Интенсификация и повышение стабильности процесса анаэробной переработки городских органических отходов // XI Молодежная школа – конференция с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии» – Москва, ИНМИ РАН, 1 – 2 ноября 2016 г.

14) Журавлева Е.А., Никитина А.А., Паршина С.Н. Выделение в чистую культуру и описание нового вида бактерии рода *Theridanaerobacter* из сброженного осадка муниципальных сточных вод // XII молодежная школа–конференция с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии», Москва, Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, 9–10 ноября 2017г, с. 40–42.

15) Журавлева Е.А., Никитина А.А. Описание нового вида термофильной синтрофной бактерии // Международная научная конференция студентов, аспирантов, и молодых ученых «Ломоносов» // Москва, МГУ им. М.В. Ломоносова, 9–13 апреля 2018 года.

Патент

Н.И. Куликов, Ю.В. Литти, А.А. Никитина, А.Н. Ножевникова. Анаэробный кислотогенный биореактор для подготовки органической фракции ТБО совместно с активным илом аэротенков канализационной очистной станции к сбраживанию для получения биогаза. Патент РФ №172189 от 30.06.2017.