

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
Федеральное государственное учреждение
"Федеральный исследовательский центр
"Фундаментальные основы биотехнологии"
Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского

На правах рукописи

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)**

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
Лигти Ю. В.

Научный консультант:
доктор биологических наук
Ножевникова А.Н

Москва – 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	6
Актуальность проблемы.....	6
Цель и задачи исследования.....	8
Научная новизна и значимость работы.....	8
Практическая значимость работы.....	9
Апробация работы.....	9
Публикации.....	10
Объем и структура диссертации.....	10
Место проведения работы и благодарности.....	10
ЧАСТЬ 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
Глава 1. Биотехнологические аспекты процесса анаэробного сбраживания органических отходов.....	11
1.1 Субстраты для процесса анаэробного сбраживания.....	11
1.1.1 Твердые бытовые отходы (ТБО) и органическая фракция ТБО.....	11
1.1.2 Пищевые отходы.....	14
1.1.3 Осадки сточных вод (ОСВ).....	15
1.1.4 Ко-ферментация различных типов отходов.....	17
1.2 Факторы, влияющие на процесс анаэробного сбраживания органических отходов.....	19
1.2.1 Компонентный состав органического вещества отходов и соотношение углерода и азота.....	19
1.2.2 Инокулят.....	22
1.2.3 Влажность и содержание сухого вещества.....	23
1.2.4 Скорость загрузки органического вещества в реактор и время удержания.....	24
1.2.5 Температура.....	26
1.2.6 Кислотность (рН) и щелочность среды.....	27
1.2.7 Концентрация летучих жирных кислот.....	28
1.2.8 Ингибиторы процесса анаэробной ферментации.....	29
1.2.9 Флокулянты.....	34
Глава 2. Микробиологические аспекты процесса анаэробного сбраживания органических отходов.....	36
2.1 Стадия гидролиза.....	37
2.2 Стадия ферментации.....	38
2.3 Синтрофная стадия.....	38

2.4 Метаногенная стадия.....	41
ЧАСТЬ 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	48
Глава 3. Объекты и методы исследования, постановка экспериментов.....	48
3.1 Субстраты.....	48
3.2 Инокуляты.....	49
3.3 Ко-ферментация пищевых отходов и избыточного активного ила в периодическом режиме.....	49
3.4 Изучение влияния флокулянта на термофильное сбраживание ОСВ в периодическом режиме.....	50
3.5 Эксперименты в лабораторном реакторе при непрерывном режиме сбраживания.....	52
3.6 Микробиологические методы.....	56
3.6.1 Среда для культивирования.....	56
3.6.2 Субстраты для культивирования.....	57
3.6.3 Получение метаногенных консорциумов, адаптированных к высоким концентрациям ЛЖК.....	58
3.6.4 Выделение чистой культуры штамма SP2.....	58
3.6.5 Определение оптимальных условий роста.....	59
3.6.6 Определение способности штамма SP2 к спорообразованию.....	60
3.6.7 Проверка способности штамма SP2 к синтрофному росту.....	60
3.6.8 Микроскопия.....	60
3.7 Аналитические методы.....	60
3.8 Молекулярно-генетические методы.....	62
3.8.1 Анализ последовательностей генов 16S рРНК.....	62
3.8.2 Молекулярное клонирование.....	64
3.8.3 Секвенирование и филогенетический анализ полученных последовательностей.....	65
3.8.4 Исследование генома штамм SP2.....	66
ЧАСТЬ 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	67
Глава 4. Процесс термофильного сбраживания коммунальных органических отходов со сниженной влажностью и повышенной нагрузкой в периодическом и непрерывном режимах..	67
4.1 Ко-ферментация пищевых отходов и осадков сточных вод.....	67
4.2 Влияние флокулянта на термофильное сбраживание уплотненных ОСВ.....	73
4.3 Совместное термофильное сбраживание ОСВ и ОФ-ТБО в лабораторном анаэробном биогазовом реакторе в непрерывных условиях.....	96
4.3.1 Запуск биогазового реактора и вывод на рабочий режим.....	96
4.3.2 Термофильная анаэробная ко-ферментация ОСВ и модельной ОФ-ТБО.....	99

5. Метаногенные консорциумы, адаптированные к высоким концентрациям летучих жирных кислот.....	108
5.1 Разложение бутирата при его возрастающей концентрации.....	108
5.2 Разложение пропионата при возрастающей концентрации при температуре 50 и 55°C.....	113
5.3 Разложение смесей летучих жирных кислот при температуре 50 и 55°C.....	118
5.4 Проверка активности метаногенных консорциумов, адаптированных к высоким концентрациям летучих жирных кислот.....	121
5.5 Изучение микробного состава метаногенного консорциума, адаптированного к концентрации бутирата 170 мМ.....	123
6. Выделение и описание новой синтрофной бактерии ' <i>Thermocaenobacter saccharolyticus</i> ' gen. nov., sp. nov. штамм SP2.....	130
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	141
ВЫВОДЫ.....	143
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	145

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

Ca. – *Candidatus*

C/N – соотношение углерода и азота

OLR – англ. organic loading rate – нагрузка по органическому веществу

SRT – solid retention time – время удержания твердых веществ

АИ – избыточный активный ил

БПК – биологическое потребление кислорода

ГВУ (HRT) – гидравлическое время удержания, англ. hydraulic retention time

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

И/С – соотношение количества инокулята и субстрата

ЛЖК – летучие жирные кислоты

ОАА – общий аммонийный азот

ОВ – органическое вещество

ОО – органические отходы

ОСВ – осадки сточных вод

ОФ-ТБО – органическая фракция твердых бытовых отходов

ПАК – полиакриловая кислота

ПАА – полиакриламид

ПО – пищевые отходы

п.н. – пар нуклеотидов

ПЦР – полимеразная цепная реакция

САА – свободный аммонийный азот (аммиак)

САОБ – синтрофные ацетат-окисляющие бактерии

СВ – сухое вещество

СРБ – сульфатредуцирующие бактерии

ТБО – твердые бытовые отходы

УФ – ультрафиолет

ХПК – химическое потребление кислорода

ВВЕДЕНИЕ

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; Schnurer, 2016; Ножевникова и др., 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 сбраживание (50–57°C) 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; De la Rubia, 2013; Ho et al., 2013).

Высокие капитальные затраты на строительство метантенков, 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 реакторов. В настоящее время наиболее перспективными путями увеличения производительности

анаэробных биореакторов считаются ко-ферментация различных видов органических отходов, снижение влажности субстратов и повышения нагрузки по органическому веществу.

Ко-ферментация ОСВ и органической фракции ТБО (ОФ-ТБО) позволяет сбалансировать состав питательных веществ и влажность смеси и 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 и повышения концентрации сухого вещества в субстрате сейчас 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 сведения о влиянии ПАА на процесс анаэробного сбраживания отходов со сниженной влажностью в термофильных условиях отсутствуют.

Анаэробное разложение органического вещества проходит в несколько последовательных стадий: гидролиз, брожение, ацетогенез и метаногенез, каждая из которых осуществляется различными группами микроорганизмов со специфическими метаболическими возможностями (Stams et al., 2012; Schnurer, 2016). Скорость роста и активность гидролитических и кислотогенных микроорганизмов выше, чем у метаногенных архей, осуществляющих с помощью синтрофных (ацетогенных) бактерий стадию трансформации промежуточных метаболитов, в первую очередь водорода и летучих жирных кислот (ЛЖК), в метан (McInerney et al., 2008; Wang et al., 2009). Это создает предпосылки для дестабилизации процесса анаэробного сбраживания отходов, вследствие избыточного накопления ЛЖК и последующего снижения рН. При превышении определенной концентрации, ЛЖК оказывают ингибирующее действие на микроорганизмы метаногенного микробного сообщества, что может привести к снижению скорости процесса, вплоть до его полной остановки (Fotidis et al., 2013; Chu et al., 2015). Изменение температуры, влажности, нагрузки по субстрату, состава субстратной смеси и других технологических факторов оказывает существенное влияние на состав микробного сообщества в реакторе (Yu et al., 2014). Осуществление процесса в термофильных условиях, с увеличенной нагрузкой и сниженной влажностью сбраживаемой смеси, повышает риск дестабилизации сбраживания (Wang et al., 2009; Duan et al., 2012; Hidaka et al., 2013). Изучение синтрофных микробных ассоциаций, участвующих в процессе

разложения отходов может служить ключом для понимания способов регуляции работы реакторов с высокой нагрузкой по ОВ (Jang et al., 2014).

Таким образом, изучение биотехнологических и микробиологических аспектов процесса анаэробного сбраживания коммунальных отходов в термофильном режиме с повышенной нагрузкой по субстрату и сниженной влажностью позволит расширить фундаментальные знания о закономерностях анаэробного разложения вещества и микроорганизмах, участвующих в этом процессе. Полученные результаты могут быть использованы для создания новых высокопроизводительных технологий анаэробной переработки органических отходов.

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 летучих жирных кислот (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 реактора 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 Пушинская

школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века», Пущино, Россия, 2015; 7) XII Latin American Symposium and Workshop on anaerobic digestion, Cusco, Peru, 2016.

Публикации

Материалы диссертации содержатся в 21 печатной работе, 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 таблицы, 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 Института микробиологии им. С.Н. Виноградского ФИЦ Биотехнологии РАН с 2012 по 2018 годы. Исследования на лабораторной анаэробной биогазовой установке 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 генов 16S рРНК и исследования генома проводили совместно с сотрудниками лаборатории молекулярной диагностики Института 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 биогазовой установке и к.б.н. Груздеву Д.С. за помощь в проведении молекулярно-биологических исследований.

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

ЧАСТЬ 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Глава 1. Биотехнологические аспекты процесса анаэробного сбраживания органических отходов

1.1. Субстраты для процесса анаэробного сбраживания

В качестве субстратов (сырья) для анаэробного сбраживания используется широкий спектр органических отходов (ОО). В зависимости от источника ОО дифференцируют на бытовые, промышленные и сельскохозяйственные, а по физическому состоянию – на жидкие (сточные воды, фильтрационные воды), полужидкие (осадки сточных вод, полужидкий навоз) и твердые (ТБО, навоз, отходы сельского хозяйства). Состав и характеристики различных видов отходов значительно варьируют в зависимости от источника отходов, региона, сезона года и ряда других причин, что оказывает существенное влияние на технологические аспекты анаэробного сбраживания и продукцию биогаза (Zhang et al., 2007; Campuzano, González-Martínez, 2016). Такие параметры, как влажность отходов, состав и содержание ОВ, соотношение сухого и органического вещества, размер частиц, биodeградеability и т.д., существенно влияют как на дизайн биореакторов, так и на условия сбраживания (Zhang et al., 2007).

Весь спектр образующихся ОО, которые могут быть подвергнуты той или иной биотехнологической обработке с целью получения различных видов энергии, входят в биоэнергетический потенциал страны. Основу биоэнергетического потенциала России составляют растительные отходы сельского хозяйства (42%), органическая фракция ТБО (25%), отходы лесной и деревообрабатывающей промышленности (23%), отходы животноводства (9%) и осадки сточных вод (1%) (Namsaraev et al., 2018). Биоэнергетический потенциал использования всех ОО в России для получения энергии и тепла биотехнологическими методами по последним оценкам составляет около $2,2 \cdot 10^{18}$ Дж в год, что составляет порядка 30% от суммарного энергопотребления страны (Namsaraev et al., 2018). Однако в настоящее время реализуется менее 12% этого потенциала (Namsaraev et al., 2018).

В данной работе рассмотрены такие виды отходов, как органическая фракция твердых бытовых отходов (ОФ-ТБО) (включая пищевые отходы) и осадки сточных вод (ОСВ).

1.1.1. Твердые бытовые отходы и органическая фракция ТБО

К твердым бытовым отходам (ТБО) относят коммунальные отходы и крупные предметы домашнего обихода, отходы различных муниципальных, торговых, медицинских и образовательных учреждений, отходы от отопительных устройств местного отопления,

уличный смет, скошенную зелень и опавшую листву (Мирный и др., 2010; 2012). В настоящее время в мире ежегодно образуется порядка 1300 млн т ТБО, по оценкам ученых их количество возрастет до 2200 млн т в год к 2025 г (Al Seady et al., 2013). В России ежегодный объем ТБО превышает 60 млн т, что составляет около 417 кг ТБО на человека в год (Namsaraev et al., 2018). Ежегодно количество образующихся бытовых отходов в России возрастает на 3–4% (Ножевникова и др., 2016).

Состав и соотношение фракций ТБО существенно различается в различных регионах мира, в сельской и городской местности, зависит от существующей системы сбора мусора и ряда других причин (табл. 1) (Boer et al., 2010; Мирный и др., 2012). В несортированном ТБО содержится достаточно большое количество тяжелых металлов, что необходимо учитывать при их биологической обработке (Xu et al. 2017; Awe et al. 2018).

Таблица 1. Сравнение состава ТБО жилого фонда и общественных учреждений России и ТБО жилого фонда Польши и США, % по массе (на основе данных Boer et al., 2010; Мирный и др., 2012; Santibañez–Aguilar et al., 2013).

Компонент	ТБО жилых помещений РФ	ТБО общественных учреждений РФ	ТБО жилых помещений Польши	ТБО жилых помещений США
Пищевые отходы	27–37	13–16	24–41	27
Бумага, картон	37–41	45–52	10–14	28–29
Дерево	1–2	3–5	1–3	–
Металлы	4–6	4–8	1,8–2,1	9
Текстиль	3–5	3–5	2,5–5,5	5–6
Стекло	2–3	1–2	9–10	4–5
Камни, штукатурка	0,5–1	2–3	1,5–3	–
Пластмасса	5–6	8–12	10–12	12
Прочее	2,5–5	3,5–6	9–10	13
Отсев (менее 15 мм)	5–7	5–7	8,5–20	–

Содержание органической фракции в сырой массе ТБО составляет около 40–60% (Camruzano et al., 2016; Clarke, 2018; Namsaraev et al., 2018). Состав ОФ-ТБО варьирует в широких пределах, начиная от пищевых и садовых отходов до упаковочных материалов и текстиля. Состав и объем продукции ОФ-ТБО изменяется в зависимости от географического региона, количества жителей, их благосостояния и пищевых привычек, сфер производственной занятости в регионе, сезона года и существующей системы сбора мусора (Camruzano et al., 2016). Для ОФ-ТБО, собираемой в крупных городах, характерно более высокое по сравнению с сельской местностью содержание упаковочных материалов (полимерные материалы, пластик, бумага, картон, цветные металлы) и меньшее содержание пищевых отходов (Ножевникова и др., 2016).

Влажность ОФ-ТБО составляет $72,8 \pm 7,6\%$, хотя может существенно изменяться (от 49,8 до 85%) в зависимости от сезона и способа сбора. При этом содержание органического вещества (ОВ) колеблется от 7,4 до 36,1%, а соотношение органического вещества к сухому веществу (ОВ/СВ) в среднем составляет $84,6 \pm 9,9\%$ (Campruzano et al., 2016). Биоразлагаемое ОВ ОФ-ТБО включает в среднем 12–23% белков, жиров – 11–24%, волокон – 14–44%, лигнина – 4–16%, целлюлозы – 3,6–33,6%, гемицеллюлозы – 4–13%, крахмала – 14,6–19,6%, свободных сахаров – 5,5–16,5% (Campruzano et al., 2016). Состав и количество ОВ в ТБО определяет эффективность сбраживания ОФ-ТБО, выход метана, время удержания и т.д. Большое значение при этом имеет система сбора и сортировки мусора. Сбраживание отдельно собираемых отходов или отходов, сортированных по источнику ОВ, обеспечивает более высокий выход метана, чем сбраживание отходов, прошедших механическую сортировку (Khalid et al. 2011). В среднем выход биогаза при сбраживании ОФ-ТБО составляет 0,3–0,53 л/г $ОВ_{исх}$ (Bolzonella et al., 2003; Angelidaki et al., 2006; Khalid et al., 2011).

Уровень pH ОФ-ТБО колеблется от 3,9 до 7,9, со средним значением 5,2 в зависимости от региона и сезона (Campruzano et al., 2016). Поэтому при использовании ОФ-ТБО в качестве субстрата необходимо контролировать pH во избежание дестабилизации процесса.

По последним оценкам в России не более 8% образующихся ТБО подвергаются повторной переработке (Namsaraev et al., 2018). Основной причиной этого является отсутствие централизованной и повсеместной системы раздельного сбора и сортировки мусора. Развитие системы сортировки мусора в странах Евросоюза способствовало увеличению объема ОФ-ТБО, перерабатываемой биологическими методами (анаэробное сбраживание и компостирование), на 69% (Clarke 2018). Тем не менее, в 2012 г лишь 5% объема собираемой ОФ-ТБО использовалось для анаэробного сбраживания в Европейских странах. В мире этот показатель еще ниже, например, 3% в Китае (Clarke, 2018).

По данным на 2006 г основная часть бытовых отходов в России утилизировалась путем вывоза на полигоны ТБО (97%), около 2% сжигалось и лишь 1% подвергалось компостированию (Пупырев, 2006). В настоящее время количество мусороперерабатывающих заводов возросло и ежегодно сжигается около 4–6 млн т ТБО (6,7–10%) (Namsaraev et al., 2018). Даже в странах с развитой системой раздельного сбора и сортировки отходов стоимость утилизации ТБО путем складирования на полигонах обходится в 4–6 раз дешевле, нежели их анаэробная переработка (Clarke, 2018).

1.1.2. Пищевые отходы

Пищевые отходы (ПО) являются одной из основных фракций ОФ-ТБО и составляют до 60% от объема образующейся ОФ-ТБО (Clarke, 2018). Ежегодно в мире образуется порядка 1,3

млрд т ПО, что составляет около трети всех пищевых ресурсов (Fisgativa et al., 2016). Изменения в составе и характеристиках ПО более всего связаны с географическим регионом, источником ПО (домашнее хозяйство, учреждения общественного питания, супермаркеты и т.д.) и сезоном года (Fisgativa et al., 2016). Помимо высокой вариабельности состава, ПО характеризуются высокой влажностью – 74–90%, и высоким соотношением органического вещества к сухому – 0,8–0,97. ПО содержат большое количество легко разлагаемых ОВ, которые быстро преобразуются анаэробными бактериями в летучие жирные кислоты (ЛЖК). В состав ОВ пищевых отходов входят: углеводы – 36 (± 21)%, гемицеллюлоза – 9 (± 5)%, целлюлоза – 9 (± 8)%, лигнин – 7 (± 6)%, белки – 21 (± 13)%, липиды – 15 (± 8)% (Fisgativa et al., 2016). Высокая степень вариации в составе связана с неоднородностью ПО в разных регионах мира. Состав ПО России и европейских стран приведен в таблице 2. Соотношение C/N ПО составляет от 14:1 до 37:1 и зависит от источника ПО (Zhang et al., 2007). Высокая влажность, высокое содержание ОВ и его биodeградебельность делает ПО привлекательным субстратом для анаэробного сбраживания (Zhang et al., 2007).

Таблица 2. Состав пищевых отходов европейских стран, % от массы (на основе данных Мирный и др., 2010; Fisgativa et al., 2016).

Состав	Великобритания	Финляндия	Португалия	Италия	РФ
Фруктовые и овощные отходы	60,9	44,5	59,2	69,0	45–74
Хлеб, мучные изделия, крупы	10,5	4,2	3,3	15,2	2
Мясо и рыба	6,7	4,3	7,3	6,2	5–8
Молочные продукты	1,7	2,0	0,7	1,4	0,5
Напитки	7,1	27,5	0,2	0	–
Кондитерские изделия и снеки	0,7	3,2	0,3	0	–
Смешанные пищевые отходы	12,3	6,3	29,0	1,4	3–4
Прочие пищевые отходы	0,2	8,0	0	6,9	5–15

В последнее время состав ПО в России изменяется, наблюдается увеличение количества фруктовых остатков. Доля ПО в ОФ-ТБО снизилась (Ножевникова и др., 2016). Состав и характеристики ПО домашних хозяйств в России изменяется в зависимости от сезона года и региона. Содержание ПО в ОФ-ТБО возрастает с 20–35%, весной до 30–35% осенью, что связано с увеличением количества потребляемых овощей и фруктов (Мирный и др., 2010). По этой же причине увеличивается влажность собираемых ПО с 72% весной до 85% осенью. ПО крупных городов содержат до 15% балластных примесей, обычно это упаковочные материалы, стекло, пластик, бумага, резина и т.д. ПО учреждений общественного питания и пищевых

производств имеют более постоянные характеристики, не изменяющиеся по сезонам года. Влажность таких отходов всегда составляет 85–90% и они обычно не содержат балластных примесей (Мирный и др., 2010).

Избыточное образование ЛЖК на ранних стадиях анаэробной ферментации может вызвать резкое падение pH и ингибирование процесса метаногенеза. ПО вне зависимости от источника имеют исходный pH около 4,9–5,3 (Fisgativa et al., 2016). Такой уровень pH неблагоприятен для микроорганизмов метаногенного сообщества, поэтому необходимо смешивать ПО с другими отходами (ко-ферментация), добавлять химические реагенты, способствующие повышению pH (CaCO_3 и т.д.) и проводить процесс при низкой нагрузке (Zhang et al., 2007; Fisgativa et al., 2016).

1.1.3. Осадки сточных вод

Осадки сточных вод (ОСВ) – это отход, образующийся в ходе физической, химической и биологической очистки сточных вод (Arnaiz et al., 2006; Appels et al., 2008). Т.к. количество сточных вод, требующих комплексной очистки, с каждым годом возрастает, растет и количество образующихся ОСВ. В Китае в период с 2007 по 2013 гг был зафиксирован ежегодный прирост объема образующихся ОСВ на 13% и к 2013 продукция ОСВ составляла 6,25 млн т сухого вещества (СВ) в год (Yang et al., 2015). В России продукция ОСВ составляет до 4,5 млн т СВ в год, в странах Евросоюза – более 10 млн т СВ, в США – около 8 млн т СВ, в Японии – около 2,2 млн т СВ (Appels et al., 2008; Ножевникова и др., 2016).

Различают 2 типа ОСВ: 1) первичный (сырой) осадок – осадок, образующийся при отстаивании сточной воды, прошедшей механическую очистку, (2) вторичный осадок – избыточный активный ил – биомасса микроорганизмов, осуществляющих биологическую очистку сточных вод, с прикрепленными к поверхности флокул неразложившимися и частично окисленными загрязняющими веществами (Лотош, 2002; Arnaiz et al., 2006). Состав и свойства образующихся ОСВ зависят от источника сточных вод (коммунальные или производственные) (Лотош, 2002). Для дальнейшей обработки первичный и вторичный ОСВ часто смешивают (Appels et al., 2008). ОСВ содержат большое количество органических веществ, минеральные вещества, а также компоненты, представляющие экологическую опасность, такие как патогенные микроорганизмы, тяжелые металлы, органические токсиканты (Astals et al., 2012; Yang et al., 2015).

В первичном ОСВ задерживается около 30–40% биологического потребления кислорода (БПК) поступившей сточной воды (Appels et al., 2008). Влажность первичного осадка составляет около 97–99%, содержание ОВ в СВ колеблется от 55 до 75% (Appels et al., 2008). Первичный ОСВ богат легкоразлагаемым ОВ, хотя состав его может достаточно сильно

изменяться. Белки составляют 17–30% от СВ, жиры – 5–21%, целлюлоза – 8–32%, ЛЖК – 60–80% (Sanchez, 2009; Ножевникова и др., 2016). Содержание лигнина в первичном ОСВ может достигать 24–29% (Sánchez, 2009). Первичный ОСВ имеет достаточно неоднородную гранулометрическую структуру, т.е. состоит из частиц различного размера: частицы размером 7–10 мм составляют 5–20% СВ, 1–7 мм – 9–33%, менее 1 мм – 50–88% (Лотош, 2002). Уровень рН составляет около 6,4 (Ножевникова и др., 2016).

Вторичный осадок образуется во вторичных отстойниках, куда сточная вода поступает после биологической очистки. Его влажность составляет 99,2–99,7%, структура однородная – 98% СВ составляют частицы размером менее 1 мм (Лотош, 2002). Часть избыточного ила возвращается в аэротенк для поддержания необходимой плотности микроорганизмов, осуществляющих очистку воды, остальная часть отправляется на уплотнение (до влажности 95–98%) (Лотош, 2002). Состав и характеристики вторичного осадка более постоянны. Содержание белков во вторичном осадке выше, чем в первичном, и достигает 32–41% от СВ, а содержание углеводов в среднем в 2 раза ниже, в том числе целлюлозы не более 7% СВ. Содержание жиров составляет 5–12% СВ, ЛЖК – 60–85% (Ножевникова и др., 2016). ОВ вторичного осадка разлагается вдвое медленнее, т.к. клеточные стенки микроорганизмов, составляющих основную массу вторичного ОСВ, устойчивы к гидролизу (Arnaiz et al., 2006). Уровень рН в среднем 6,6–6,8.

Первичный и вторичный осадок образуются в среднем в соотношении 1/1 по СВ, однако доля СВ сырого осадка может повышаться, если при очистке стоков используются химические реагенты или технологические приемы, способствующие более эффективному осаждению взвешенных частиц (Ножевникова и др., 2016).

За счет сброса производственных стоков в коммунальную канализацию в образующихся при очистке ОСВ накапливаются тяжелые металлы (Appels et al., 2008; Пахненко, 2015). Около 50–80% тяжелых металлов, поступающих со стоками, фиксируются в биомассе ОСВ в ходе процедуры очистки. Содержание тяжелых металлов в ОСВ в среднем составляет около 0,5–2,0% от СВ, однако в некоторых случаях может достигать до 6% от СВ (Pathak et al., 2009). Часть тяжелых металлов в составе ОСВ связана с органикой и не проявляет прямой токсичности, но при разложении ОВ происходит высвобождение тяжелых металлов, и они начинают оказывать неблагоприятное воздействие на окружающую среду (Xu et al., 2017). Для оценки экологической безопасности ОСВ производится мониторинг концентрации кадмия, хрома, меди, цинка, никеля, свинца, ртути и мышьяка. В некоторых странах помимо перечисленных оцениваются концентрации селена, молибдена, марганца и кобальта (Appels et al., 2008; Pathak et al., 2009; Xu et al., 2017). Для удаления тяжелых металлов из стоков используется осаждение с помощью химических реактивов, электрохимические и

ионообменные методы, фильтрация и мембранные технологии, сорбция на различных сорбентах, микробные технологии (Pathak et al., 2009; Xu et al., 2017).

Еще одним параметром, важным для оценки экологической безопасности ОСВ, является загрязненность осадков патогенными микроорганизмами (Pathak et al., 2009; Ножевникова и др., 2016). В ОСВ обнаруживают патогенных бактерий (патогенные штаммы *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Vibrio cholerae*, *Mycobacterium tuberculosis* и др.), патогенные вирусы (*Hepatovirus* sp., *Enterovirus* sp., *Reovirus* sp. и др.), возбудителей протозойных инфекций (*Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidium*) и яйца гельминтов (*Ascaris* sp.) (Pathak et al., 2009; Ножевникова и др., 2016). Обработка химическими реагентами, озонирование, УФ-обработка позволяют избавиться от патогенов в очищенных стоках. Для обеззараживания ОСВ используют различные физические, химические и биохимические методы (Ножевникова и др., 2016). Одним из наиболее эффективных методов является термофильное сбраживание (Bolzonella et al., 2012).

В настоящее время основным способом утилизации ОСВ остается вывоз на полигоны ТБО после сушки на иловых площадках. В сельском хозяйстве в качестве биоудобрений используется менее 7% ОСВ (Ножевникова и др., 2016). Технология анаэробного сбраживания ОСВ с целью получения тепловой и/или электроэнергии в России осуществляется лишь на нескольких крупных очистных сооружениях, таких как Люберецкие и Курьяновские очистные станции в г. Москва. Следует отметить, что в России применяется только термофильная анаэробная обработка ОСВ, что связано с обеззараживающим эффектом данного метода. Согласно теоретическим оценкам, при использовании всех образующихся в крупных и средних городах РФ ОСВ для метаногенного сбраживания, можно было бы компенсировать около 27% годового потребления электроэнергии (Namsaraev et al., 2018).

Выход метана при сбраживании ОСВ значительно варьирует, но в среднем составляет 0,16–0,35 л/г ОВ (Schnürer, Jarvis., 2010). Существует зависимость между возрастом вторичного ОСВ (временем, которое он пребывал в аэротенке) и выходом метана. При увеличении возраста активного ила с 2 до 15 сут наблюдалось снижение выхода метана с 0,18 до 0,07 л/г ОВ_{исх} (Bolzonella et al., 2005). ОСВ также может использоваться в качестве дополнительного субстрата для повышения влажности сбраживаемой смеси и оптимизации соотношения C/N (Khalid et al. 2011; Mata-Alvarez et al., 2011; Mata-Alvarez et al., 2014).

1.1.4. Ко-ферментация различных типов отходов

Первые работы, посвященные изучению совместного сбраживания различных видов ОО, появились в конце 1970-х гг., а устойчивый интерес и новый подход к изучению ко-ферментации сформировался в середине 2000-х гг (Mata-Alvarez et al., 2014). В настоящее время

ко-ферментация различных видов отходов считается одним из наиболее эффективных способов повышения эффективности и стабильности анаэробного сбраживания (Mata-Alvarez et al., 2011; Awe et al., 2016). Суть ко-ферментации в том, чтобы подобрать несколько субстратов и их соотношение таким образом, чтобы (1) сбалансировать состав питательных веществ и сформировать оптимальные условия для сбраживания (отношение C/N, влажность, pH и буферная емкость), (2) избежать ингибирования (контроль за концентрацией аммония, ингибиторов анаэробных микроорганизмов), (3) повысить выход биогаза и стабильность процесса, 4) увеличить разнообразие микроорганизмов, участвующих в деградации ОВ отходов (Mata-Alvarez et al., 2011, Esposito et al., 2012).

Высокое содержание углеводов и жиров в отходах ведет к высокому соотношению C/N, а с увеличением количества белков показатель C/N снижается. Избыток углеводов грозит дестабилизацией процесса в связи с накоплением избытка ЛЖК, белков – с накоплением аммония, жиров – с ингибированием жирными кислотами и слипанием бактериальных агрегатов (Esposito et al., 2012; Awe et al., 2018; Ferguson et al., 2016; Xu et al., 2017). Отходы злаковых имеют высокое соотношение C/N, отличаются низким pH и низкой буферной емкостью, при их сбраживании часто наблюдается избыточное накопление ЛЖК (Wang et al., 2012). У лигноцеллюлозных отходов с высоким содержанием лигнина (древесные отходы) показатель C/N выше 100/1, что приводит к нехватке азота для микроорганизмов, участвующих в сбраживании (Zhang et al., 2008). Навоз и птичий помет обладают высокой буферностью и низким соотношением C/N. При их сбраживании выделяется много аммония, который может ингибировать процесс (Wang et al., 2012). Избыточный активный ил содержит много белков, т.е. имеет низкий показатель C/N (Mata-Alvarez et al., 2011). У первичного осадка соотношение C/N выше, содержание жиров, углеводов и доступного ОВ тоже выше, поэтому его добавление может способствовать ускорению процесса сбраживания и повышению выхода метана (Mata-Alvarez et al., 2011, 2014). Использование смеси субстратов позволяет добиться оптимального соотношения питательных веществ, необходимых для роста микроорганизмов, и оптимального соотношения C/N, а также избежать дестабилизации процесса за счет накопления ЛЖК, аммония и других ингибиторов (Khalid et al., 2011; Mata-Alvarez et al., 2011; Esposito et al., 2012).

В большинстве случаев выход биогаза при ко-ферментации выше, чем сумма выходов метана, образующегося при сбраживании отдельных субстратов (Mata-Alvarez et al., 2011). Сбраживаемость сырья также выше в условиях ко-ферментации, что позволяет увеличивать нагрузку на биореактор (Astals et al., 2014).

При сбраживании смеси ОСВ и ОФ-ТБО в соотношении 60/40 по ОВ на крупномасштабном производстве (реакторы объемом 1500 и 3500 м³) удалось добиться

увеличения выхода метана в 5 раз и скорости метаногенеза в 3,3 раза по сравнению со сбраживанием ОСВ (Bolzonella et al., 2006). При совместном сбраживании ОСВ и ПО в соотношении 50/50 по ОБ наблюдали увеличение выхода метана в 1,85 раза при повышении общей стабильности процесса (Kim et al., 2003).

Совместное сбраживание смеси различных отходов обеспечивает развитие метаногенного сообщества с высоким разнообразием микроорганизмов, которое улучшает глубину разложения сырья, так как в реакторе создаются различные альтернативные типы синтрофных взаимодействий, которые повышают стабильность и эффективность процесса (Mata-Alvarez et al., 2011; Astals et al., 2014; Xu et al., 2017). В биореакторах, сбраживающих только один вид сырья, формируется устойчивое микробное сообщество, которое приспособлено к разложению определенных веществ, входящих в состав субстрата, и в меньшей степени устойчиво и адаптивно (Mata-Alvarez et al., 2011; Esposito et al., 2012).

Использование смеси субстратов позволяет масштабировать процесс, т.к. смягчаются ограничения от использования одного типа сырья: лимитированный объем сырья и высокие затраты на его транспортировку (Wang et al., 2012).

Оптимальное соотношение субстратов в смеси не может быть эффективно предсказано, поэтому перед запуском крупных биореакторов рекомендуется проведение экспериментальных исследований (Esposito et al., 2012).

1.2 Факторы, влияющие на процесс анаэробного сбраживания органических отходов

Эффективность процесса анаэробного сбраживания органических отходов (ОО) зависит от многих факторов, таких как состав и количество ОБ в субстрате, скорость его загрузки и время пребывания в реакторе, соотношения C/N в сбраживаемой массе, активность инокулята, температура, pH, содержание СВ и влажность, присутствие ингибиторов, конструкция и тип работы биореактора и т.д.

1.2.1 Компонентный состав органического вещества отходов и соотношение углерода и азота

Энергетический потенциал углеводов, жиров и белков различается, что при их анаэробном разложении выражается в разном выходе биогаза и содержании метана. В среднем при разложении 1 г ОБ углеводов образуется около 0,38 л биогаза с содержанием метана 50%. Наибольшее количество биогаза – 1,0 л/г ОБ – образуется при разложении жиров, при этом содержание метана может достигать 70%. Белки обеспечивают средний выход биогаза – 0,53 л/г ОБ с содержанием метана около 60% (Schnurer, Jarvis, 2010). Зная соотношение углеводов,

жиров и белков в субстрате, можно рассчитать теоретический выход метана (**метановый потенциал**) для этого субстрата. Теоретический метановый потенциал – это показатель, описывающий максимальный возможный выход метана, основываясь на данных о компонентном составе субстрата (Angelidaki et al., 2011). Биохимический метановый потенциал отражает реальный выход метана при сбраживании различных субстратов. Этот показатель определяется экспериментально (Raposo et al., 2011). В табл. 3 представлены данные о среднем выходе метана для различных субстратов.

Таблица 3. Выход метана при отдельном сбраживании и ко-ферментации различных органических отходов.

Субстрат	Выход метана, мл/г ОВ	Ссылки
ОСВ	120–350	Schnurer, Jarvis, 2010; Iacovidou et al., 2012
Пищевые отходы	200–500	Raposo et al., 2011; Iacovidou et al., 2012
Фруктово-овощные отходы	100–500	Schnurer, Jarvis, 2010; Raposo et al., 2011
ОФ-ТБО	160–580	Raposo et al., 2011; Campuzano et al., 2016
Навоз	100–300	Schnurer, Jarvis, 2010
Злаки	520–700	Esposito et al., 2012
Солома	100–320	Schnurer, Jarvis, 2010
Отходы скотобоен	350–900	Schnurer, Jarvis, 2010; Raposo et al., 2011
Сахарная свекла	340–770	Raposo et al., 2011; Esposito et al., 2012
ОСВ+ОФ-ТБО	150–450	Esposito et al., 2012
ОСВ+пищевые отходы	180–440	Iacovidou et al., 2012
Навоз +ОСВ	330–400	Borowski et al., 2014
Навоз+ОФ-ТБО	400–510	El-Mashad, Zhang, 2010

На практике выход биогаза оказывается меньше теоретического максимума, даже при работе биореактора в оптимальном режиме. Это связано с рядом факторов: 1) степень разложения ОВ субстрата даже в оптимальных условиях составляет 30–70%, 2) около 5% энергии расходуется на построение ОВ биомассы, 3) часть ОВ отходов представлена трудно- или неразлагаемой органикой, 4) недостаток витаминов, микроэлементов или других необходимых для микроорганизмов веществ (Angelidaki et al., 2011). Кроме того, органические компоненты субстрата находятся на разных стадиях окисления. Чем выше биодegradабельность ОВ субстрата и меньше содержание частично окисленного ОВ, тем выше будет выход метана в результате анаэробного сбраживания (Angelidaki et al., 2011).

Компонентный состав ОВ отходов и их смесей определяет один из важнейших параметров, обеспечивающих успешность анаэробного сбраживания, а именно **соотношение углерода и азота (C/N)** (Wang et al., 2012). Углерод и азот являются наиболее важными питательными компонентами, необходимыми всем живым организмам, при этом важно, чтобы

они были в подходящем соотношении, иначе какой-то из компонентов будет в недостатке или в избытке, что лимитирует рост и развитие микроорганизмов. Оптимальным для микроорганизмов метаногенного сообщества считается соотношение C/N в диапазоне 20/1–30/1 с оптимумом при 25/1 (Mata-Alvarez et al., 2011, 2014; Wang et al., 2012). Однако некоторые авторы рекомендуют и более низкое соотношение C/N. В таблице 4 приведены данные о соотношении C/N в различных видах ОО.

Таблица 4. Соотношение C/N некоторых видов органических отходов.

Отходы	Соотношение C/N	Ссылки
Пищевые отходы	3–34	Ножевникова и др., 2016; Xu et al., 2017
ОСВ	6–11	Ahmadi-Pirlou et al., 2017
Навоз крупного рогатого скота	2–22	Wang et al., 2012, 2016; Xu et al., 2017
Свиной навоз	7–13	Xu et al., 2017
Птичий помет	8–11	Wang et al., 2012, 2016
Солома (пшеничная, рисовая)	43–150	Ножевникова и др., 2016; Xu et al., 2017
Зеленые садовые отходы	12–55	Ножевникова и др., 2016; Xu et al., 2017
Лигноцеллюлозные отходы	до 173–1000	Znang et al., 2008

Углеводы в анаэробных условиях разлагаются с образованием ЛЖК. В ходе анаэробного разложения белков и жиров образуются, соответственно, аммиак или ионы аммония и длинноцепочечные жирные кислоты (Schnürer, Jarvis, 2010; Shah et al., 2014).

Количество образующихся интермедиатов зависит от компонентного состава отхода, который в свою очередь определяет соотношения C/N в сбраживаемой массе. Например, состав и соотношение образующихся ЛЖК существенно зависит от соотношения C/N: количество ацетата, пропионата, бутирата и изо-бутирата уменьшается, а количество валерата и капроната увеличивается при снижении C/N (Rughoonundun et al., 2012). Такая закономерность связана с тем, что ацетат, пропионат и бутират образуются из углеводов, а валерат и капронат – при дезаминировании аминокислот, образующихся во время разложения белков (Rughoonundun et al., 2012). Избыток какого-либо компонента в сбраживаемой смеси может привести к снижению выхода биогаза и даже полной дестабилизации процесса сбраживания. При высокой нагрузке по субстрату, содержащему большое количество легкоразлагаемых углеводов, происходит избыточное накопление ЛЖК и снижение pH. При снижении соотношения C/N и увеличении доли отходов, богатых белками, накапливаются аммоний и аммиак, являющиеся ингибиторами метаногенеза. Длинноцепочечные жирные кислоты, образующиеся при разложении жиров, накапливаясь в концентрации выше 0,2 г/л, подавляют активность микроорганизмов метаногенного сообщества, а также могут вызывать вспенивание в реакторе (Schnurer, Jarvis, 2010; Angelidaki et al., 2011).

1.2.2 Инокулят

Сложный состав ОО и низкая плотность анаэробных микроорганизмов, заселяющих их в основном во время сбора, транспортировки и хранения, приводит к необходимости внесения активного анаэробного микробного сообщества – инокулята для запуска процесса анаэробного сбраживания. В качестве источников анаэробных микроорганизмов используют сброженный ОСВ, навоз крупного рогатого скота, содержимое рубца жвачных животных, почвенные экстракты, осадки водоемов и др. (Raposo et al., 2011; Shah et al., 2014). Наиболее часто в качестве инокулятов используют сброженную биомассу или фильтраты из рабочего метантенка, при этом для стабильной работы биореактора предпочтительнее осуществлять возврат сброженной массы, чем жидкой фракции (Ножевникова и др., 2016). Наиболее распространенным типом предобработки инокулята является его прединкубация с теми отходами, которые будут сбраживаться в реакторе (Raposo et al., 2011). Приемлемым способом получения термофильного инокулята считается продолжительная (более 30 сут) адаптация мезофильного сообщества, например, мезофильно сброженного ОСВ (De la Rubia et al., 2013). Использование активного инокулята позволяет уменьшить его количество (Shah et al., 2014).

Подбор подходящего инокулята является одним из ключевых аспектов, обеспечивающих эффективный запуск и стабильную работу анаэробного биореактора. Используемый для запуска биореактора инокулят, а именно состав, плотность и соотношение различных групп анаэробных микроорганизмов метаногенного сообщества, непосредственно влияет на скорость и глубину разложения ОВ отходов, количество образующегося биогаза, а также на стабильность всего процесса (Shah et al., 2014). Выбор инокулята должен быть продиктован, в первую очередь, сбраживаемым субстратом, а также конструктивными особенностями биореактора (Forster-Carneiro et al., 2007; Shah et al., 2014). Соотношение бактерий и архей в инокуляте также оказывает большое влияние. Показано, что чем больше метаногенных архей в инокуляте, тем короче лаг-фаза и стабильнее работа термофильного реактора (McMahon et al., 2004).

Соотношение инокулята к субстрату (И/С) – один из важнейших параметров, определяющих эффективность запуска биореактора и дальнейшую стабильность его работы. И/С влияет на скорость разложения отходов, скорость и выход биогаза, продолжительность лаг-фазы, количество и состав ЛЖК, устойчивость микробного сообщества к ингибиторам (Shah et al., 2014; Kawai et al., 2014). Соотношение И/С обычно рассчитывается на базе содержания ОВ в субстрате и инокуляте. Большинство авторов отмечает, что для эффективного первичного запуска процесса анаэробного сбраживания следует смешивать инокулят и субстрат в соотношении не менее 1:1 (по ОВ) и увеличивать долю инокулята при сбраживании отходов, богатых доступной органикой (ПО, ОФ-ТБО, навоз) (Shah et al., 2014; Kawai et al., 2014).

1.2.3 Влажность и содержание сухого вещества

Влажность оказывает большое влияние на процесс анаэробного сбраживания, от нее зависит эффективность массопереноса, т.к. только растворенные субстраты могут быть использованы микроорганизмами, также она обеспечивает подвижность бактерий и диффузию интермедиатов и продуктов в среде (Liotta et al., 2014). В зависимости от влажности отходов и содержания сухого вещества (СВ) различают 3 основных типа анаэробного сбраживания: жидкофазное – содержание СВ менее 10%, полужидкое – содержание СВ 10–15% и твердофазное – содержание СВ более 15% (Liotta et al., 2014; Liotta et al., 2014a; Chu et al., 2015). Сбраживание отходов, содержащих более 30% СВ, неэффективно в связи с нарушением массопереноса, избыточным накоплением ЛЖК, снижением рН, лимитированием активности гидролитических бактерий и метаногенных архей (Abbassi-Guendouz et al., 2012; Liotta et al., 2014a). Существенное значение при этом имеет тип субстрата и соотношение содержания органического вещества к сухому веществу (ОВ/СВ) – чем оно выше, тем более вероятна дестабилизация (Hidaka et al., 2013). При мезофильном сбраживании ОФ-ТБО удалось добиться повышения содержания СВ в субстрате до 32–40%, т.к. ОВ/СВ не превышало 0,4 (Guendouz et al., 2008). При этом для ПО с соотношением ОВ/СВ, равным 0,95, не удалось достичь стабильной работы при содержании СВ выше 15% (Hidaka et al., 2013).

Сбраживание отходов, в первую очередь ОСВ, в жидкофазном режиме, но со сниженной влажностью (90–95%), является в последнее время одним из привлекательных и активно изучаемых способов повышения эффективности работы анаэробных биореакторов. Снижение влажности до 95% и менее позволяет уменьшить необходимый объем реактора или увеличить его производительность, снизить потребление воды и расходы на очистку фильтрационных вод, снизить тепловые потери и энергоемкость процесса, повысить выход биогаза, упростить дальнейшую утилизацию сброженной массы и уменьшить расходы на ее транспортировку (Duan et al., 2012; Liotta et al., 2014; Hidaka et al., 2013). Однако с увеличением содержания СВ повышается риск дестабилизации анаэробного процесса, в первую очередь за счет ингибирования аммонием и накопления ЛЖК, особенно в термофильных условиях (Hidaka et al., 2013; Duan et al., 2012; Chu et al., 2015).

Снижение влажности ОСВ до 90–91% (9–10% СВ), в целом, не оказывает существенного негативного влияния на стабильность мезофильного сбраживания (Fujishima et al., 2000; Duan et al., 2012; Hidaka et al., 2013). Однако при снижении влажности менее 90% скорость метаногенеза резко падает в связи с выделением большого количества аммония (≥ 3000 мг N–NH₄/л) (Fujishima et al., 2000; Duan et al., 2012). В термофильных условиях процесс сбраживания ОСВ стабилен при содержании СВ 6,0–7,4% (Bolzonella et al., 2012; Wang et al., 2014). Однако при увеличении содержания до СВ 7,5–9,5% наблюдалось сильное ингибирование

метаногенной активности за счет высокой концентрации аммония (Hidaka et al., 2013; Wang et al., 2014).

1.2.4 Скорость загрузки органического вещества в реактор и время удержания

Скорость загрузки органического вещества субстрата (нагрузка по ОВ) (англ. organic loading rate, OLR) – это количество ОВ субстрата, подаваемого в реактор в единицу времени на единицу объема реактора (Abdelgadir et al., 2014; Leite et al., 2015). Средняя нагрузка для реактора, сбраживающего ОФ-ТБО в мезофильном и термофильном режимах, составляет около 2–3 и 4–5 кг ОВ/(м³ сут) (Schnurer, Jarvis, 2010; Mata-Alvarez et al., 2014). Для реакторов, сбраживающих ОСВ, OLR обычно не превышает 1 кг ОВ/(м³ сут) из-за высокой влажности осадков (Mataalvarez et al., 2014). При сбалансированной работе нагрузка (OLR) для термофильного реактора может быть вдвое больше, чем для мезофильного (De la Rubia, 2013). OLR зависит от содержания ОВ в субстрате, его состава и соотношения C/N (Schnurer, Jarvis, 2010; Khan et al., 2016). Чтобы рассчитать OLR, нужно знать общее содержание СВ и ОВ в субстрате или влажность субстрата и соотношение ОВ/СВ. Кроме того, большое значение имеют конфигурация биореактора и тип процесса сбраживания (Khan et al., 2016; Ножевникова и др., 2016).

Нагрузка по ОВ – один из основных параметров, описывающих производительность реактора и определяющих экономическую эффективность работы реактора (Schnurer, Jarvis, 2010; Shen et al., 2018).

OLR оказывает существенное влияние на стабильность процесса. При запуске биореактора необходимо существенно снизить OLR, чтобы избежать ингибирования процесса и накопить необходимую плотность активных микроорганизмов (De la Rubia, 2013). Вывод реактора на рабочую нагрузку обычно занимает несколько месяцев, особенно в случаях смены субстрата или температуры сбраживания.

Избыточная нагрузка чревата снижением выхода метана и даже полной дестабилизацией процесса сбраживания в первую очередь из-за накопления ЛЖК и/или аммония. Кроме того, чрезмерное повышение OLR может привести к: 1) избыточному пенообразованию, 2) накоплению в сбраживаемой биомассе недеградируемых компонентов субстрата, что снижает производительность биореактора, 3) накоплению биогаза в нижних областях реактора, что приведет к всплыванию биомассы, 4) накоплению ингибиторов метаногенеза (Mahmoud et al., 2003; Abdelgadir et al., 2014; Ferguson et al., 2016).

Увеличение OLR за счет снижения времени удержания часто приводит к снижению эффективности удаления СВ (Mahmoud et al., 2003).

Использование двухстадийного процесса анаэробного сбраживания, когда кислотогенная и метаногенная стадия разнесены в разные реакторы и появляется возможность создать условия, наиболее благоприятные для каждой из этих стадий, позволяет существенно увеличить нагрузку в системе (Khan et al., 2016).

Малая нагрузка снижает риск дестабилизации процесса из-за избыточного накопления интермедиатов или ингибиторов. Однако выход метана и производительность биореактора при этом будут низкими (Raposo et al., 2011).

HRT, SRT и степень разложения. Скорость загрузки ОВ тесно связана со временем удержания субстрата в биореакторе, т.к. оба этих показателя имеют критическое значение для оптимизации процесса сбраживания (Schnurer, Jarvis, 2010). Время удержания (англ. retention time) – это время, требующееся для замены полного объема содержимого биореактора, оно зависит от времени, необходимого для полной переработки поступившего субстрата (Raposo et al., 2011). Для контроля процесса сбраживания используют **гидравлическое время удержания**, ГВУ (англ. hydraulic retention time, HRT) и **время удержания сухого вещества** (англ. solids retention time, SRT). HRT описывает среднюю продолжительность пребывания в реакторе жидкой фракции с растворенными в ней органическими и минеральными веществами, а SRT – продолжительность пребывания в реакторе твердой фракции сбраживаемой массы (Abdelgadir et al., 2014; Khan et al., 2016). От времени удержания и нагрузки зависит степень разложения ОВ субстрата (Apples et al., 2008). В процессах, где не предусмотрен возврат биомассы, продолжительность HRT и SRT равна (Apples et al., 2008). Время удержания (HRT) должно быть больше времени удвоения самых медленно растущих организмов, осуществляющих анаэробное разложение вещества. Чаще всего, это метаногенные археи (Abdelgadir et al., 2014; Khan et al., 2016; Ножевникова и др., 2016). Микроорганизмы растут и разлагают субстраты с определенной скоростью, поэтому для повышения их активности необходимо создавать стабильные условия с определенными OLR, HRT и SRT (Schnurer, Jarvis, 2010). Слишком короткое HRT и SRT приводит к вымыванию активной биомассы из реактора, ингибированию метаногенеза за счет накопления ЛЖК и, как следствие, снижению выхода метана и дестабилизации сбраживания (Khan et al., 2016; Ножевникова и др., 2016). В среднем HRT составляет 10–16 сут для биореакторов, работающих в термофильном режиме, и около 15–25 сут для мезофильных реакторов (Schnurer, Jarvis, 2010; Ножевникова и др., 2016). Снижение HRT приводит к уменьшению эффективности удаления ОВ субстрата (Mahmoud et al., 2003, Apples et al., 2008). Изменение SRT часто приводит к изменению состава микробной популяции, что сказывается на эффективности процесса (Mahmoud et al., 2003). Показано, что снижение SRT с 30 до 12 сут при сбраживании уплотненных ОСВ способствует увеличению плотности активной микробиоты, что положительно сказывается на выходе биогаза. Однако дальнейшее

снижение SRT до 9, а затем до 4 сут приводит к полному ингибированию метаногенеза и образованию большого количества пены в биореакторе (Khan et al., 2016).

1.2.5 Температура

Метаногенез может протекать в интервале температур от 0°C (*Methanosarcina soligelidi*, *M. lacustris*) до 110°C (*Methanopyrus kandleri*) (Rospert et al., 1991; Wagner et al., 2013). На практике наиболее распространена эксплуатации анаэробных биореакторов в мезофильных (30–43°C) и термофильных (48–60°C) условиях с оптимумами при 35°C и 55°C, соответственно (De la Rubia et al., 2013). В 2014 г. около 67% биореакторов в мире эксплуатировались в мезофильном режиме и 33% в термофильном (De Baere, Mattheeuws, 2014).

Сбраживание в термофильных условиях позволяет проводить процесс при более высокой нагрузке и уменьшить время удержания отходов в метантенке (Khalid et al., 2011; De la Rubia, 2013; Но et al., 2013; Shah et al., 2014). Скорость образования метана и его выход в термофильных условиях также выше, чем в мезофильных. Болзонелла с соавт. показали, что при сбраживании ОСВ в термофильных условиях выход биогаза был на 36% выше, чем в мезофильных (Bolzonella et al., 2012). Термофильные условия способствуют более глубокому разложению ОБ также за счет повышения растворимости органических соединений и уменьшения степени кристаллизации целлюлозы (Moen et al., 2003; Bolzonella et al., 2012; Tsavkelova, Netrusov, 2012). В ходе термофильного сбраживания достигается обеззараживание отходов. Это имеет большое значение для дальнейшей утилизации сброженной биомассы и ее использования в сельском и озеленительном хозяйствах (Chen et al., 2008; De la Rubia, 2013; Но, 2013). В термофильном режиме инактивация энтеробактерий, *Salmonella* spp. и *Mycobacterium* spp. происходит в течение суток, в то время как при мезофильном режиме жизнеспособные патогены обнаруживаются спустя месяц инкубации (Pérez-Elvira et al., 2011; Bolzonella et al., 2012). К другим преимуществам термофильного процесса также относят: устойчивость к пенообразованию (за счет перехода жиров и масел в жидкую фазу), большая водоотдача, более высокий pH (обусловлено более высокой константой Генри для CO₂ и высокими скоростями разложения ОБ) и т.д. (Moen et al., 2003; Bolzonella et al., 2012; De la Rubia, 2013).

Основным ограничением термофильного сбраживания является снижением стабильности по сравнению с мезофильным процессом (Chen et al., 2008; Bolzonella et al., 2012; De la Rubia, 2013). Образующиеся в результате термофильного сбраживания фильтраты обычно содержат большее количество растворенных веществ, поэтому необходима их дополнительная обработка (Moen et al., 2003; Bolzonella et al., 2012). Термофильные биореакторы нуждаются в системе подогрева, что удорожает их эксплуатацию. Термофильные микроорганизмы более чувствительны к перепадам температур, что может приводить к снижению скорости

метаногенеза, и дестабилизации процесса сбраживания в целом (Wu et al., 2006; Suryawanshi et al., 2010; De la Rubia, 2013). При этом отмечается, что восстановление активного процесса возможно (Wu et al., 2006).

Анаэробное сбраживание при пониженных температурах (25–10°C) также достаточно активно изучается. Низкотемпературное сбраживание не требует затрат на подогрев реактора, позволяет стабильно сбраживать отходы с высоким содержанием СВ, подходит для стабилизации неразбавленного навоза в навозохранилищах (Connaughton et al., 2006; McKeown et al., 2009; Giard et al., 2013; Saady, Massé, 2015). Т.к. скорость роста психрофильных микроорганизмов мала, запуск реактора и обработка отходов занимает длительное время (Saady, Massé, 2015). В психрофильных условиях стадия гидролиза становится лимитирующей, а также затрудняется разложение длинноцепочечных жирных кислот, накопление которых может приводить к ингибированию процесса сбраживания (Giard et al., 2013; Saady, Massé, 2015).

1.2.6. Кислотность (рН) и щелочность среды

Каждая из функциональных групп микроорганизмов, осуществляющих процесс анаэробного разложения ОВ, имеет свой оптимальный диапазон рН (Khalid et al., 2011). Метаногены наиболее чувствительны к уровню рН – метаногенез возможен в диапазоне рН от 6,0 до 8,5 с оптимумом от 6,5 до 7,2 (Appels et al., 2008). Гидролитические и ферментирующие бактерии проявляют активность в более широком диапазоне рН от 4,5 до 8,5 (Kim et al., 2003; Appels et al., 2008; Kawai et al., 2014). Уровень рН, близкий к 6,0, считается наиболее благоприятным для стадий гидролиза и кислотогенеза (Ponsá et al., 2008). Термофильные микроорганизмы более чувствительны к изменениям рН, нежели мезофильные (Kim et al., 2003; Kawai et al., 2014). Используя двухстадийный процесс, можно создать условия рН, оптимальные для различных групп микроорганизмов, тем самым повысив эффективность разложения ОВ отходов (Khan et al., 2016).

Щелочность формируется в среде за счет CO_2 , бикарбоната (HCO_3^-) и ионов аммония. Эти вещества, а также ЛЖК и некоторые другие ионы обеспечивают системе буферную емкость, т.е. способность поддерживать определенные условия среды при сбоях рН (Appels et al., 2008; Khan et al., 2016). Для создания высокой буферной емкости щелочность должна поддерживаться на уровне около 3 г/л CaCO_3 (Ножевникова и др., 2016). При снижении рН для поддержания высокой буферной емкости и повышения щелочности вносят гидроксиды натрия или кальция, соду или карбонат натрия (Schnurer, 2016).

В сбалансированном метаногенном сообществе существуют естественные механизмы контроля рН, реализуемые за счет процессов подкисления и подщелачивания (Appels et al.,

2008). Образование ЛЖК в процессе разложения ОВ ведет к снижению рН, незначительное подкисление происходит за счет образования H_2CO_3 при гидратации CO_2 и выделения сероводорода. К повышению рН приводит потребление ЛЖК и выделение аммония при дезаминировании белковых субстратов (Ножевникова и др., 2016).

Высокая нагрузка, малое время удержания, неэффективный инокулят и ряд других причин могут привести к дисбалансу рН (Appels et al., 2008; Kawai et al., 2014). Закисление среды оказывает более негативное влияние на процесс метаногенеза, нежели ее защелачивание. Продолжительное (≥ 3 сут) снижение рН ниже 5,0 приводит к долговременной, часто необратимой дестабилизации процесса. При этом при продолжительной инкубации при рН выше 9,0 метаногенез также прекращается, однако процесс быстро восстанавливается после возврата к оптимальным значениям рН (Ножевникова и др., 2016).

Существует зависимость между выходом биогаза и содержанием в нем метана и рН. При снижении рН ниже 6,0 вследствие избыточного накопления ЛЖК выход метана стремительно падает. При этом если в системе поддерживается рН на уровне выше 6,5, то выход метана не будет зависеть от концентрации ЛЖК (Kawai et al., 2014).

1.2.7 Концентрация летучих жирных кислот

ЛЖК являются важнейшими промежуточными продуктами анаэробного разложения ОВ. Основной пул ЛЖК составляют ацетат, пропионат и бутират. Низкая концентрация ЛЖК считается показателем стабильности процесса анаэробного сбраживания (Schnurer, Jarvus, 2010; Fotidis et al., 2013). Избыточное накопление ЛЖК с последующим снижением рН является одной из наиболее частых причин дестабилизации анаэробных реакторов, особенно в термофильных условиях (Fotidis et al., 2013; Wang et al., 2009). Скорости преобразования ЛЖК в метан располагаются в следующем порядке: Ацетат >Бутират >Пропионат (Wang et al., 2009). Скорость преобразования ЛЖК в ацетат – конечный продукт метаболизма ацетогенных бактерий – оказывает влияние на количество метаногенов и их активность, а, соответственно, на стабильность процесса и выход биогаза. Общая скорость разложения ЛЖК определяется скоростью разложения пропионата и, зачастую, мало зависит от концентраций других ЛЖК. Несмотря на ключевое значение ЛЖК для стабильности процесса сбраживания, данные относительно ингибирующих концентраций противоречивы. Известно, что пропионат оказывает наиболее выраженное ингибирующее действие на анаэробные микроорганизмы (Wang et al., 2009). Степень ингибирования метаногенеза пропионатом зависит от рН (чем ниже рН, тем более выражен негативный эффект), а также от подаваемого субстрата (чем сложнее субстрат, тем сильнее ингибирование) (Wang et al., 2009). Накопление пропионата может стать причиной накопления бутирата и других более длинноцепочечных ЛЖК (Lins et al., 2010).

Установлено, что концентрация пропионата 951 мг/л (13 мМ) подавляет рост метаногенных архей (Demirel, Yenigün, 2002). Ванг с соавт. показали, что при концентрации пропионата больше 900 мг/л (12 мМ), существенно снижается активность ацетогенных бактерий, что приводит к ингибированию активности метаногенов (Wang et al., 2009). При этом другие исследователи не наблюдали негативных изменений при концентрации пропионата 2750 мг/л (38 мМ) (Pullammanappallil et al., 2001).

Несмотря на то, что количество бутирата, образующегося при разложении ОО, значительно выше, чем пропионата, его влияние на процесс метаногенеза изучено значительно слабее. Недостаточно данных о концентрациях бутирата, оказывающих ингибирующее действие на сообщество, а также каким образом сообщество адаптируется для преодоления этого неблагоприятного воздействия. В результате разложения 1 мМ бутирата образуется 2 мМ ацетата, поэтому ингибирующее действие бутирата, вероятнее всего, связано с резким повышением концентрации ацетата (Wang et al. 2009). При концентрациях ацетата, пропионата и бутирата, равных 4125 (70 мМ), 2856 (40 мМ) и 3456.5 (40 мМ) мг/л соответственно, наблюдалась полная дестабилизация мезофильного процесса (Wang et al. 2009). При концентрации ацетата и этанола 2400 мг/л и бутирата 1800 мг/л не наблюдалось существенного ингибирующего эффекта. Доган с соавт. установили, что добавление 13 (220,2 мМ), 15 (172,2 мМ) и 3,5 (47,9 мМ) г/л ацетата, бутирата и пропионата, соответственно, приводит к снижению продукции метана в 2 раза (Dogan et al., 2005). Активность ацетокластических метаногенов снижалась уже при концентрации ацетата 4 г/л. По другим данным ингибирующие концентрации ацетата варьируют от 1400 до 4800 мг/л (Lins et al., 2010).

В условиях, когда деградация ацетата по тем или иным причинам нарушается, возможно накопление пропионата и бутирата, т.к. декарбоксилирование пропионовой кислоты и β -окисление бутирата становятся термодинамически невыгодными (Schink, 1997). Это приводит к еще более глубокой дестабилизации процесса.

1.2.8 Ингибиторы процесса анаэробной ферментации

Достаточно широкий спектр органических и неорганических веществ может оказывать ингибирующее действие на микроорганизмы метаногенного сообщества, что, в свою очередь, может стать причиной снижения скорости метаногенеза, накопления ЛЖК и дестабилизации процесса анаэробного сбраживания (Chen et al., 2008; Chen et al., 2014). Кроме токсичных веществ, присутствующих в отходах, ингибиторами могут быть продукты анаэробного разложения ОВ, которые накапливаются в больших концентрациях вследствие несбалансированной работы микробного сообщества или неправильно подобранных условий работы биореактора. Типичными ингибиторами являются аммиак и ионы аммония, сульфид и

сероводород, кислород, ионы легких и тяжелых металлов, ЛЖК, длинноцепочечные жирные кислоты, ароматические соединения и другие органические вещества. Уровень токсичности различных веществ сильно варьирует, что связано со сложной организацией метаногенного сообщества, в котором на процесс ингибирования могут значительно влиять механизмы антагонизма, синергизма, акклиматизации и др. (Chen et al., 2008).

В анаэробных условиях **водород** образуется на стадии гидролиза органических веществ и в результате деятельности синтрофных бактерий, а потребляется гидрогенотрофными метаногенами, сульфатредуцирующими и гомоацетатными бактериями. Если метаногенное сообщество функционирует сбалансированно, то концентрация H_2 в среде ничтожно мала. Даже незначительное повышение парциального давления водорода p_{H_2} выше 10^{-5} – 10^{-4} атм. приводит к нарушению активности бактерий, утилизирующих ЛЖК, делая эти реакции термодинамически невыгодными (Appels et al., 2008). Увеличение концентрации водорода приводит к накоплению ЛЖК, в первую очередь пропионата, что может привести к дестабилизации работы анаэробного реактора (Wang et al., 2009).

Аммиак является одним из основных ингибиторов анаэробного сбраживания ОВ. Он образуется в результате биоразложения органических азотсодержащих веществ, в основном белков и мочевины, и в жидкой среде существует в двух формах: в виде ионов аммония (NH_4^+) и собственно растворенного аммиака (NH_3 , англ. free ammonia). Растворенный аммиак обладает большей токсичностью, т.к. легко проникает сквозь клеточную мембрану (Siles et al., 2010; Fotidis et al., 2013; Chen et al., 2014). Выделяют несколько основных механизмов ингибирования клеток аммиаком: изменение внутриклеточного рН, ингибирование специфических ферментативных реакций, протонный дисбаланс и дефицит калия, увеличение энергетических затрат клетки (Fotidis et al., 2013). Концентрация аммиака до 200 мг/л считается благоприятной для анаэробных процессов, т.к. азот является одним из важнейших макроэлементов (Chen et al., 2008). Информация об ингибирующих концентрациях аммиака варьирует. Так, Чен с соавт. приводят данные, что концентрация аммиака (в пересчете на общий растворенный аммонийный азот – ОАА), при которой активность метаногенеза снижается на 50%, составляет от 1,7 до 14 г/л (Chen et al., 2008). Ингибирующий эффект аммиака усиливается с увеличением рН среды и температуры за счет сдвига равновесия в сторону образования растворенного аммиака (Chen et al., 2008; Chen et al., 2014). На токсичность аммиака влияют такие факторы, как присутствие ионов-антагонистов (Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , PO_4^{3-}), особенности субстрата и инокулята, адаптация микроорганизмов (Chen et al., 2008). Ингибирование, вызванное накоплением аммонийного азота, может привести к накоплению ЛЖК и снижению рН, что в совокупности может спровоцировать полную дестабилизацию анаэробного сбраживания (Ножевникова и др., 2016). Высокая концентрация (4–6 г/л ОАА) мало сказывается на активности гидролитических и

кислотогенных бактерий, однако существенно снижает активность метаногенов (Chen et al., 2008). Показано, что высокая концентрация аммонийного азота препятствует агрегации микроорганизмов метаногенного сообщества (Hulshoff Pol et al., 1983). Многие исследователи считают, что ацетокластические метаногены более чувствительны к повышению концентрации аммиака, чем гидрогенотрофные. Однако имеются и противоположные данные (Fotidis et al., 2013; Chen et al., 2008). Показано, что активность *Methanospirillum hungatei* полностью подавлялась при концентрации 4,2 г/л ОАА, в то время, как *Methanosarcina barkeri*, *Methanothermobacter thermoautotrophicus* и *Methanobacterium formicicum* сохраняли свою активность при концентрации выше 10 г/л ОАА. Метаногенные археи способны адаптироваться к высоким концентрациям аммонийного азота, вплоть до 7–11 г/л ОАА (Chen et al., 2008; Fotidis et al., 2013).

Присутствующий в промышленных отходах **сульфат** в анаэробных условиях восстанавливается сульфатредуцирующими бактериями (СРБ) до **сероводорода (сульфида)** (Siles et al., 2010; Chen et al., 2014; Kallistova et al., 2014). Результатом сульфатредукции является ингибирование метаногенного сообщества за счет конкуренции за общие субстраты и токсического действия H_2S . Конкуренция между СРБ и метаногенами за субстраты приводит к ингибированию процесса метаногенеза. СРБ не способны разлагать биополимеры, поэтому не конкурируют с гидролитическими и ферментирующими бактериями (Chen et al., 2008). Энергетическая выгода, высокое сродство сульфатредукторов к H_2 и пропионату, а также более высокие скорости роста позволяет им эффективно конкурировать с гидрогенотрофными метаногенами и пропионат-утилизирующими синтрофными бактериями (Chen et al., 2008; Omil et al., 1996). Показано, что в термофильных условиях H_2 -использующие метаногены получают преимущество в борьбе за водород с СРБ, однако причины этого явления не ясны (Colleran, Pender, 2002). Ацетокластические метаногены получают преимущество за счет более высокого сродства к ацетату, но высокие скорости роста СРБ могут способствовать их доминированию (Colleran, Pender, 2002; Chen et al., 2008).

Сероводород обладает высокой токсичностью по отношению к различным группам бактерий метаногенного сообщества. Попадая в клетку, он вызывает денатурацию белков, нарушает взаимодействие ферментов с их ко-факторами и дестабилизирует метаболизм серы (Chen et al., 2008; Siles et al., 2010; Chen et al., 2014). Химическое состояние H_2S и, как следствие, его токсичность зависит от pH: при pH 6,0 и ниже большая часть сероводорода находится в свободной форме H_2S , легко проникает в клетки и нарушает их работу, в то время как при pH выше 8,0 H_2S переходит в форму HS^- (Chen et al., 2014). Ингибирующие концентрации сероводорода и растворенного сульфида составляют 50–400 мг/л и 100–800 мг/л, соответственно (Parkin et al., 1990). Ацетокластические метаногены более чувствительны к

повышению концентрации сероводорода в среде, чем H_2 -использующие. Ферментативные бактерии и ацетогены по уровню устойчивости к ингибированию сероводородом сравнимы с СРБ (Chen et al., 2008). Для повышения устойчивости метаногенного сообщества к повышению концентраций сульфата и/или сероводорода (сульфида) в реакторе рекомендуется использовать различные удерживающие материалы, способствующие предотвращению вымывания биомассы (Omil et al., 1996; Colleran, Pender, 2002; Chen et al., 2008; Chen et al., 2014). Это позволяет добиться устойчивости метаногенных архей к концентрациям свободного сероводорода до 1000 мг/л (Chen et al., 2008).

Ионы легких металлов (калий, натрий, магний, кальций, алюминий) присутствуют во всех типах органических отходов и являются необходимыми для микроорганизмов веществами. Однако, избыточные концентрации этих металлов, которые могут накапливаться в процессе разложения ОВ или вносятся как добавки для контроля рН, приводят к ингибированию анаэробных микроорганизмов. Термофильные микроорганизмы более чувствительны к повышению концентрации ионов легких металлов, особенно калия и натрия (Chen et al., 2008). Накопление ионов калия в концентрации выше 400 мг/л приводит к снижению эффективности анаэробного сбраживания, при этом ацетат-утилизирующие микроорганизмы более чувствительны к ингибированию калием (Kugelman, McCarty, 1964). Чувствительность различных групп анаэробных микроорганизмов к повышению концентрации NaCl снижается в ряду целлюлозолитические > ацетокластические > пропионат утилизирующие > гидрогенотрофные микроорганизмы (Chen et al., 2008). Повышенная соленость ингибирует процесс гранулообразования, тем самым значительно снижая эффективность взаимодействия различных групп микроорганизмов метаногенного сообщества и скорость метаногенеза (Gagliano et al., 2017). Оптимальная концентрация ионов натрия составляет до 300 мг/л, концентрация 3500–5500 мг/л вызывает умеренное ингибирование процесса анаэробного сбраживания, при концентрации выше 8000 мг/л наступает устойчивое ингибирование (Kugelman, McCarty, 1964; Chen et al., 2008). Тем не менее, агрегированные в гранулы метаногенные илы возможно адаптировать к концентрации NaCl до 20 г/л и добиться высокопродуктивного метаногенеза (Gagliano et al., 2017).

Ингибирующее действие ионов магния проявляется при концентрации выше 400 мг/л и выражается в нарушении агрегации микроорганизмов метаногенного сообщества, что приводит к снижению метаногенной активности (Chen et al., 2008). Оптимальная для метаногенных архей концентрация ионов кальция составляет 200 мг/л, при концентрации выше 8000 мг/л наблюдается устойчивое ингибирование анаэробного сбраживания (Kugelman, McCarty, 1964). Присутствие ионов кальция играет существенную роль в процессе агрегации микроорганизмов метаногенного сообщества и обеспечивает устойчивость образующихся гранул (Gagliano et al.,

2017). Накопление кальция вызывает осаждение карбоната и фосфата, что может приводить к (1) образованию твердых отложений на стенках реактора, (2) образованию твердых отложений в биомассе, снижению массопереноса и, как следствие, снижению метаногенной активности, и (3) потере буферной емкости и важных для анаэробного разложения питательных веществ (Chen et al., 2008; Ножевникова и др., 2016). Присутствие алюминия в концентрации более 1500 мг/л приводит к существенному подавлению активности метаногенных и синтрофных бактерий. Механизм ингибирования связан с конкуренцией ионов алюминия с ионами магния и железа и адгезией на поверхности клеток (Chen et al., 2008).

Ионы тяжелых металлов, такие как медь, цинк, никель, свинец, железо, хром, кобальт, кадмий, могут присутствовать в промышленных стоках и ОСВ в значительных количествах. Они могут накапливаться до потенциально токсичных концентраций (Chen et al., 2008, Chen et al., 2014). Накопление тяжелых металлов является одной из основных причин сбоев в работе анаэробных реакторов, обрабатывающих промышленные стоки (Chen et al., 2008), а также делает невозможным использование сброженной массы в качестве биоудобрения (Khalid et al., 2011). Известно несколько основных механизмов токсичности тяжелых металлов: 1) замена металла в протетических группах ферментов, 2) устойчивое связывание с сульфгидрильными группами и кислотными остатками аминокислот, что приводит к нарушению структуры и функции белков, 3) инактивация меркаптогрупп в коэнзиме М метаногенов (Chen et al., 2014). Подавляющие активность анаэробных микроорганизмов концентрации тяжелых металлов достаточно сильно варьируют: Cu – от 70–400 мг/л, Zn – от 200–600 мг/л, Ni – от 10–2000 мг/л (Chen et al., 2014). Метаногены более чувствительны к присутствию тяжелых металлов, чем ацетогены (Zayed, Winter, 2000).

К органическим веществам, оказывающим ингибирующее действие на метаногенное сообщество, относятся: галогензамещенные органические соединения, ароматические соединения, длинноцепочечные жирные кислоты, спирты, акрилаты, детергенты, продукты гидролиза лигнина, антибиотики, пестициды, гербициды и др. (Chen et al., 2008; Chen et al., 2014). Многие органические вещества плохо растворимы в воде, гидрофобны, легко адсорбируются на поверхности клеток и встраиваются в клеточные мембраны, накапливаясь в больших концентрациях, нарушая клеточный транспорт и оказывая сильное токсичное действие (Chen et al., 2008). Термофильные микроорганизмы более чувствительны к органическим ингибиторам, чем мезофильные. Это связано с особенностями строения мембран. Анаэробные микроорганизмы способны адаптироваться к присутствию органических ингибиторов. Показано, что быстрее других адаптируются бактерии-броидильщики, затем водород-использующие метаногены, медленнее всего адаптация происходит у ацетогенов и ацетокластических метаногенов (Cirne, et al., 2007).

1.2.9 Флокулянты

Для повышения эффективности разделения жидкой и твердой фаз различных свежих и сброженных отходов, в первую очередь, сточных вод и ОСВ, широко используют флокулянты (Campos et al., 2008; Lee et al., 2014; Lu et al., 2014). Эффективность флокулянтов оценивается по следующим параметрам: удаление взвешенных частиц и органического вещества, снижение мутности и цветности, малая рабочая концентрация. Различают несколько типов флокулянтов: химические коагулянты–флокулянты (органические и неорганические), биофлокулянты и привитые (комбинированные) сополимерные флокулянты (рис. 1) (Lee et al., 2014).

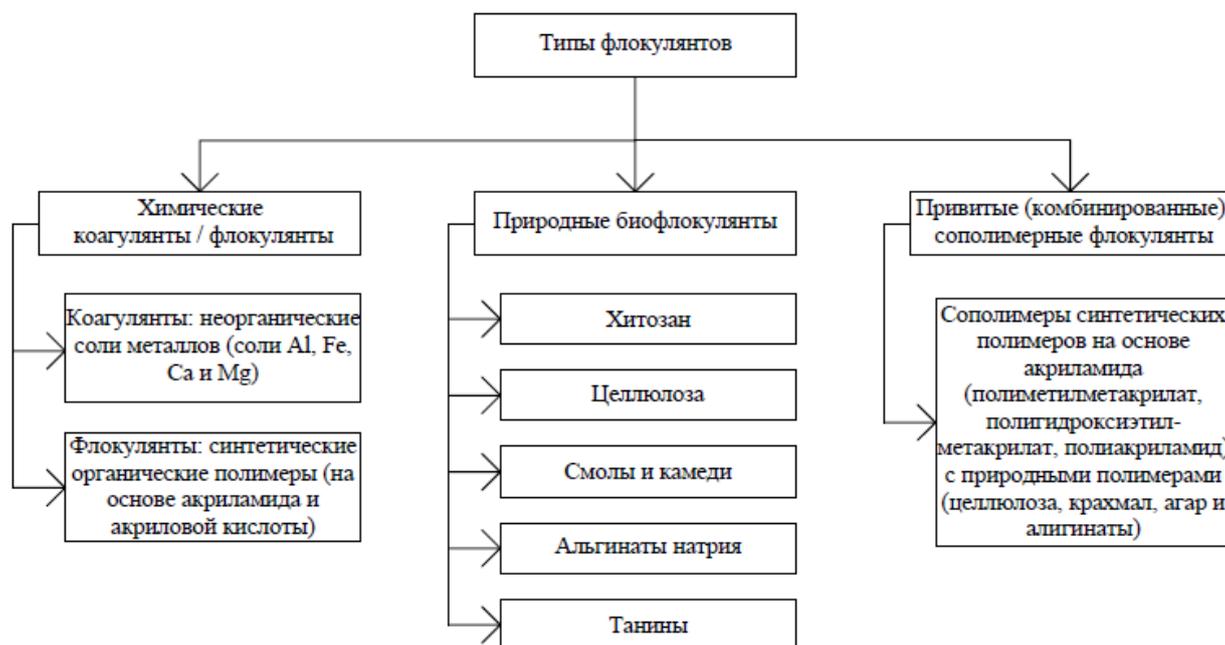


Рис. 1. Разновидности флокулянтов.

Большинство природных коллоидов, содержащихся в сточных водах, ОСВ и других органических отходах, заряжены отрицательно, поэтому наиболее эффективными для их флокуляции являются положительно заряженные (катионные) молекулы (Lee et al., 2014; Lu et al., 2014).

В настоящее время на практике чаще других используются полимерные органические флокулянты на основе полиакриламида (ПАА) (Campos et al., 2008; Gonzalez-Fernandez et al., 2008; Lee et al., 2014; Lu et al., 2014). Флокулянты на основе ПАА обладают рядом преимуществ: низкая рабочая концентрация (обычно 2,5–5,0 г/кг СВ), возможность синтезировать ПАА с различным зарядом и плотностью заряда, формирование крупных и устойчивых флокул, высокая растворимость в воде, независимость от pH, резистентность к биодegradации, сравнительно невысокая стоимость и т.д. (Bolto, Gregory, 2007; Campos et al., 2008, Gonzalez-Fernandez et al., 2008; Lee et al., 2014; Lu et al., 2014).

Уплотненные с применением флокулянтов ОСВ и другие отходы в дальнейшем подвергаются обычной технологии переработки, часто это анаэробное сбраживание. Данные о влиянии флокулянтов на основе ПАА на сбраживаемость обработанных ими отходов противоречивы и имеются только для мезофильного сбраживания. Микроорганизмы способны разлагать ПАА в аэробных и в анаэробных условиях, однако в анаэробных условиях деградация происходит медленно (Campos et al., 2008; Gonzalez-Fernandez et al., 2008; Dai et al., 2014). Основными промежуточными продуктами, образующимися при деградации ПАА, являются полиакриловая кислота (ПАК), акриламид и акриловая кислота. При этом ПАК ингибирует все стадии разложения ОВ: гидролиз, кислотогенез и метаногенез, а акриламид и акриловая кислота оказывают наибольшее негативное воздействие на метаногенную стадию (Wang et al., 2018). Продукты разложения ПАА могут быть использованы микроорганизмами в качестве источников азота и углерода (Dai et al., 2014). Токсичность ПАА зависит от заряда и концентрации: катионные флокулянты на основе ПАА обладают большей токсичностью, чем анионные и неионогенные (Bolto, Gregory, 2007). Известно, что ПАА не оказывает токсического действия на анаэробные микроорганизмы при концентрации до 415 г/кг СВ, однако эффективность сбраживания существенно снижается при концентрации выше 12 г/кг СВ (Campos et al., 2008). Болзонелла с соавт. обнаружили отсутствие ингибирующего действия на процесс анаэробного сбраживания ОСВ, обработанных катионным флокулянтом на основе ПАА в концентрации 5–30 г/кг СВ (Bolzonella et al., 2005). Чу с соавт. установили, что использование анионного и неионогенного ПАА-флокулянта (15–40 г/кг СВ) не влияло на сбраживаемость ОСВ, в то время обработанные катионным флокулянтом ОСВ в первые 6 сут сбраживались с более высокой скоростью, однако, общий выход биогаза в конце эксперимента был на 23–47% ниже (Chu et al., 2005). Эл-Мамоуни с соавт. наблюдали увеличение выхода биогаза за счет улучшения массопереноса ацетата и H_2 (El-Mamouni et al., 1998).

Альтернативой для химических флокулянтов являются природные биофлокулянты. Эти молекулы легко разлагаются, не наносят вреда окружающей среде, при этом они достаточно устойчивы, способ их получения достаточно прост (Bolto, Gregory, 2007). Основой для биофлокулянтов являются природные полимеры: хитозан, целлюлоза, камеди, смолы, альгинаты и т.д. (Lee et al., 2014). Биофлокулянты безопасно использовать для очистки питьевой воды. Осадки, полученные при обработке стоков биофлокулянтами, легко сбраживаются в анаэробных условиях (Renault et al., 2009). Однако некоторые существенные недостатки ограничивают их использование (Lee et al., 2014). Для повышения устойчивости и эффективности биофлокулянтов получают привитые (комбинированные) сополимерные флокулянты (англ. grafted flocculants) – на полисахаридную цепочку «прививают» синтетические полимерные ветви (Pal et al., 2012).

Глава 2. Микробиологические аспекты процесса анаэробного сбраживания органических отходов

Анаэробное разложение органического вещества – это сложный многоступенчатый процесс, требующий совместной активности нескольких групп микроорганизмов с различными метаболическими возможностями (Stams et al., 2012; Schnürer, 2016).

Процесс анаэробной деградации ОВ включает четыре последовательные стадии (рис. 2):

1. стадию гидролиза сложных биополимеров (полисахаридов, липидов, белков) на более простые олиго- и мономеры: углеводы и простые сахара, длинноцепочечные жирные кислоты и глицерин, аминокислоты и т.д.;
2. стадию ферментации (брожение, кислотогенез) – образовавшиеся в ходе гидролиза мономеры сбраживаются до более простых веществ – ЛЖК, спиртов, углекислого газа и водорода;
3. синтрофную стадию (ацетогенез) – окисление ЛЖК и спиртов синтрофными бактериями с образованием ацетата, водорода и углекислого газа;
4. метаногенную стадию, в ходе которой метаногенные археи образуют метан – конечный продукт анаэробного разложения ОВ, если в среде отсутствуют другие акцепторы электронов (сульфат, нитрат, Fe (III)).

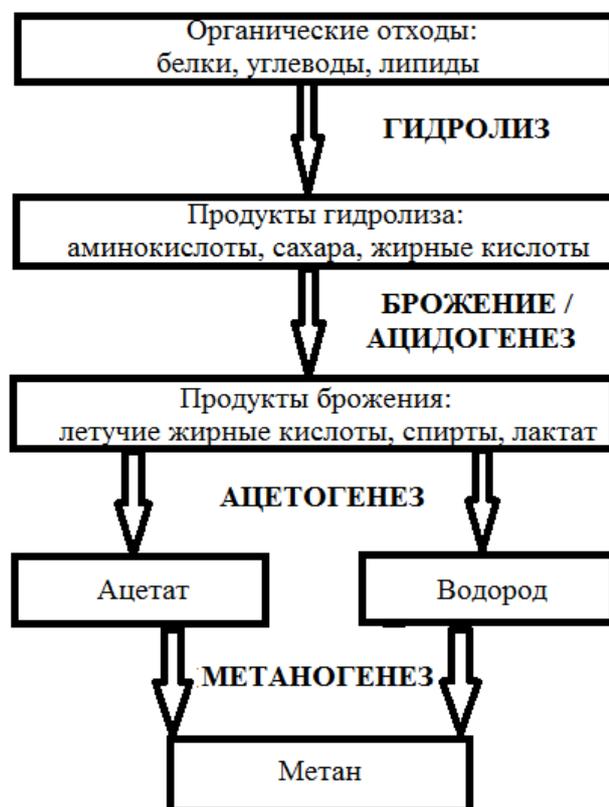


Рис. 2. Схема разложения органического вещества анаэробным метаногенным сообществом.

Микроорганизмы, осуществляющие каждую стадию, соединены трофическими связями, без реализации которых минерализация органического вещества в метаногенном сообществе была бы невозможна. Водород является основным регуляторным метаболитом в метаногенном сообществе. Метаногенные археи обеспечивают поддержание низкого парциального давления водорода, изменяют метаболизм гидролитических и бродильных бактерий и обеспечивают протекание реакций синтрофного разложения ЛЖК (Schink, 1997; McInerney et al., 2008; Ножевникова и др., 2016).

Микробный состав метаногенного сообщества зависит от ряда факторов: источник инокулята, характеристики сбраживаемого субстрата, температура и т.д. Видовое разнообразие микроорганизмов термофильного метаногенного сообщества меньше, чем в мезофильном сообществе. Согласно данным молекулярного анализа, количество видов, участвующих в процессе термофильного сбраживания ОСВ, примерно в 2,6 раза меньше, чем в мезофильном процессе (De la Rubia et al., 2013). С развитием молекулярных методов установлено присутствие в метаногенном сообществе большого количества микроорганизмов, функции которых не известны, тем не менее, вполне возможно, что они активно участвуют в процессе разложения ОВ или выполняют вспомогательную функцию, обеспечивая микроорганизмов ключевых групп факторами роста и т.д. (Ножевникова и др., 2016).

2.1 Стадия гидролиза

На стадии гидролиза биополимеры (белки, жиры и полисахариды) разлагаются гидролитическими бактериями до соответствующих мономеров за счет активности внеклеточных ферментов (протеаз, липаз, амилаз, целлюлаз и т.д.), прикрепленных к клеточной стенке или выделяемых в среду (Schnurer, 2016; Venkiteshwaran et al., 2016). Гидролитические бактерии отличаются высокими скоростями роста и устойчивостью к изменениям условий среды (температура, pH) (Venkiteshwaran et al., 2016). Они существуют в условиях избытка субстрата, пока весь субстрат не подвергнут гидролизу (Ножевникова и др., 2016). Многие гидролитики являются факультативными анаэробами (De la Rubia et al., 2013). При сбраживании устойчивых субстратов, например, лигноцеллюлозы или ОСВ, гидролиз становится лимитирующей стадией анаэробного процесса (Schnurer, 2016; Venkiteshwaran et al., 2016). Гидролитические бактерии филогенетически разнообразны. Наибольшее количество гидролитиков встречается среди представителей филумов *Bacteroidetes* и *Fimicutes* (Ножевникова и др., 2016; Venkiteshwaran et al., 2016). В зависимости от веществ, разлагаемых гидролитическими бактериями, их подразделяют на протеолитические, сахаролитические и липолитические. Протеолитики встречаются среди представителей родов *Clostridium*, *Coprothermobacter*, *Anaerosalibacter*, *Caloramator*, *Butyrivibrio* и др. Сахаролитические бактерии

распространены среди родов *Clostridium*, *Bacteroides*, *Ruminococcus*, *Thermoanaerobacter*, *Acetivibrio*, *Fibrobacter* и др. Липолитические бактерии встречаются в родах *Clostridium*, *Bacillus*, *Selenomonas* и др. Многие бактерии обладают способностью гидролизовать различные типы биополимеров, а затем сбраживать образующиеся мономеры (Ножевникова и др., 2016; Venkiteshwaran et al., 2016). Анаэробные грибы также играют большую роль в разложении ОВ в метаногенном сообществе (Schnurer, 2016).

2.2 Стадия ферментации

На стадии ферментации (кислотогенеза) продукты гидролиза преобразуются бродильными бактериями в смесь ЛЖК (ацетат, пропионат, бутират, изобутират, валерат, изовалерат), лактат, спирты, формиат, водород и CO₂. Гидролитические бактерии обеспечивают бродильщиков субстратами для роста. Бродильщики, в свою очередь, поддерживают концентрацию продуктов гидролиза на определенном уровне, необходимом для синтеза гидролитических ферментов. Бродильщики отличаются высокими скоростями роста и метаболизма, поэтому при недостаточной активности микроорганизмов, утилизирующих ЛЖК, происходит их накопление. Бродильные бактерии различаются в зависимости от способности образовывать молекулярный водород. К бактериям, не способным образовывать водород в качестве продукта брожения, относятся молочнокислые и пропионовокислые бактерии. Продукты метаболизма бактерий, способных образовывать водород, варьируют в зависимости от парциального давления водорода: при низком парциальном давлении водорода образуются ацетат и CO₂, при высоком – ЛЖК, этанол и лактат (Madigan, Marrs, 1997; Schnürer, 2016).

Бродильные бактерии встречаются среди представителей филумов *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Firmicutes* и *Proteobacteria*, родах *Bacteroides*, *Spirochaeta*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus* и др. (Ножевникова и др., 2016; Venkiteshwaran et al., 2016).

2.3 Синтрофная стадия

Синтрофная или ацетогенная стадия является одной из важнейших стадий анаэробного разложения органики. ЛЖК и спирты, образовавшиеся в результате предыдущих стадий, окисляются синтрофными бактериями до субстратов метаногенеза – ацетата, водорода и CO₂. Синтрофия предполагает наличие близких контактов между микроорганизмами–партнерами и синхронизации их метаболизма, а также функционирование обратного транспорта электронов (McInerney et al., 2009).

Синтрофные реакции относятся к термодинамически невыгодным, т.е. обладают положительной ΔG^0 (табл. 5). Такие реакции возможны только при очень низких

концентрациях конечных продуктов, в первую очередь, водорода, а также формиата и ацетата. Энергия поступает за счет обратного транспорта электронов. Низкий выход энергии в результате синтрофных реакций приводит к низким скоростям роста ацетогенных бактерий ($<0,005 \text{ ч}^{-1}$) и малому приросту биомассы (около 2,6 г сухого веса на 1 моль пропионата) (McInerney et al., 2009). В связи с низкими скоростями синтрофную стадию считают одной из двух основных лимитирующих скорость анаэробного разложения ОВ стадий (первая стадия – стадия гидролиза) (Kato, Watanabe, 2010; Venkiteshwaran et al., 2016).

Таблица 5. Уравнения реакций синтрофного разложения летучих жирных кислот (Stams et al., 2012; Dolfing, 2014).

Уравнения реакций	ΔG^0 , кДж/моль
Синтрофное разложение ацетата $\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+ + 2\text{H}_2\text{O} = 2\text{CO}_2 + 4\text{H}_2$	+95
Синтрофное разложение пропионата $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- + 3\text{H}_2\text{O} = \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ + 3\text{H}_2$ $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- + 2\text{HCO}_3^- = \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+ + 3 \text{HCOO}^-$	+76 +72
Синтрофное разложение бутирата $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^- + 2\text{H}_2\text{O} = 2\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+ + 2\text{H}_2$ $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^- + 2\text{HCO}_3^- = 2\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+ + 2 \text{HCOO}^- + 3\text{H}_2\text{O}$	+48 +46

Благодаря достижениям в области молекулярной биологии удалось установить, что синтрофные бактерии зачастую обладают небольшим геномом, специализированным для использования ограниченного спектра субстратов. При этом гены ключевых ферментов, участвующих в синтрофных реакциях, в особенности гены ферментов, отвечающих за активацию ЛЖК (ацетил-КоА–синтетаза) и транспорт электронов на водород/формиат, представлены во многих копиях (Butler et al., 2009; McInerney et al., 2009). На примере *Pelotomaculum thermopropionicum* было показано наличие кластеризации генов синтрофного метаболизма в структуры, схожие с оперонами (Kato, Watanabe, 2010).

Пропионат и бутират являются основными промежуточными продуктами разложения органического вещества после ацетата. В зависимости от сбраживаемого субстрата около 20–43% метана образуются в результате полного микробного разложения пропионата и бутирата синтрофными бактериями и метаногенными археями (Stams et al., 2012).

Пропионат-окисляющие синтрофные бактерии. Синтрофное разложение пропионата протекает только при концентрации водорода ниже 10^{-4} атм. (Kato, Watanabe, 2010). Большинство пропионат-окисляющих синтрофов осуществляют процесс через метилмалонил-КоА путь. Процесс начинается с активации молекулы пропионата до пропионил-КоА и дальнейшего карбоксилирования до метилмалонил–КоА, который затем преобразуется в сукцинат через сукцинил-КоА. Сукцинат окисляется в фумарат, затем в малат и оксалоацетат.

Из последнего путем декарбоксилирования образуется пируват, который преобразуется в ацетил-КоА и далее образуется ацетат (McInerney et al., 2008). Второй путь реализует только один известный к настоящему моменту вид – *Smithella propionica*. Две молекулы пропионата преобразуются в одну молекулу бутирата и одну молекулу ацетата, затем бутират окисляется до двух молекул ацетата и водорода (de Bok et al., 2001; Stams et al., 2012). Многие пропионат-окисляющие синтрофы способны расти в чистой культуре на среде с пируватом или фумаратом и только два известных в настоящее время вида являются облигатными пропионат-использующими синтрофами: *Pelotomaculum schinkii* и *P. propionicicum*. Бактерии, способные к синтрофному разложению пропионата, филогенетически родственны нескольким группам сульфатредуцирующих бактерий, поэтому многие из них способны использовать сульфат в качестве акцептора электронов (de Bok et al., 2001; Stams et al., 2012).

К пропионат-окисляющим синтрофным бактериям относятся представители родов *Syntrophobacter*, *Smithella*, *Pelotomaculum*, *Desulfotomaculum* (Schink, 1997; Stams et al., 2012).

Бутират-окисляющие синтрофные бактерии. Процесс синтрофного разложения бутирата возможен при парциальном давлении водорода в среде, не превышающем 10^{-4} (Kato, Watanabe, 2010; Venkiteshwaran et al., 2016). Многие бутират-использующие синтрофы способны к росту в чистой культуре на кротонате. Однако некоторые, например, *Syntrophomonas zehnderi* и *S. sapovorans*, являются облигатными синтрофами, способными расти только совместно с водород-использующими метаногенами. Разложение бутирата и кислот с более длинной цепью осуществляется путем β -окисления, сутью которого является отщепление ацетильных групп, которые через ряд преобразований превращаются в ацетат, водород и формиат (McInerney et al., 2008; Stams et al., 2012). Бутират-использующие синтрофы относятся к родам *Syntrophomonas*, *Syntrophus*, *Syntrophothermus*, *Thermosyntropha* (McInerney et al., 2008).

Синтрофные ацетат-окисляющие бактерии. В последнее время появляется все больше доказательств большого значения синтрофных ацетат-окисляющих бактерий (САОБ), способных осуществлять реакции разложения ацетата до водорода и углекислоты в присутствии водород-использующего метаногена (Hao et al., 2011; Ho et al., 2013; Westerholm et al., 2016). В настоящее время выделено лишь несколько САОБ, а именно: термофильные *Thermacetogenium phaeum* (Hattori et al., 2000) и *Pseudothermotoga lettingae* (Balk et al., 2002), термотолерантный *Tepidanaerobacter acetatoxydans* (Westerholm et al., 2011) и мезофильные *Clostridium ultunense* (Schnurer et al., 1996) и *Syntrophaceticus schinkii* (Westerholm et al., 2010). САОБ активно участвуют в разложении ОВ, считается, что наибольший вклад в процесс они вносят при изменении условий сбраживания, например, повышении нагрузки по ОВ в биореакторе, повышении температуры, а также при высокой концентрации аммония и водорода

(Westerholm et al., 2011; Westerholm et al., 2017). Несмотря на то, что САОБ обнаружены в различных природных анаэробных экосистемах, им по-прежнему приписывают значимость в основном в антропогенных системах – биореакторах, полигонах ТБО и т.д. Достоверные оценки вклада САОБ в процесс образования метана в природе пока отсутствуют (Hao et al., 2011; Ho et al., 2013; Westerholm et al., 2016). В термофильных условиях вклад САОБ в образование метана выше, чем в мезофильных (Ho et al., 2013; Westerholm et al., 2016). В сбалансированном сообществе численность ацетат-окисляющих синтрофов достаточно мала, что затрудняет их обнаружение с помощью молекулярных методов и выделение новых видов (Westerholm et al., 2016; Westerholm et al., 2017). Наиболее перспективными для поиска новых САОБ являются семейства *Thermoanaerobacteraceae* и *Thermodesulfobiaceae* (Ho et al., 2013; Yamada et al., 2015) и филумы *Spirochaetes* (Lee et al., 2015) и *Synergistes* (Ito et al., 2011; Westerholm et al., 2017).

К ацетогенным бактериям относятся также **гомоацетогены**, которые способны осуществлять синтез ацетата из водорода и углекислого газа ($4\text{H}_2 + 2\text{CO}_2 = \text{CH}_3\text{COOH} + 2\text{H}_2\text{O}$). Гомоацетогены способствуют переключению пути метаногенеза в сторону ацетокластического и могут конкурировать за водород с гидрогенотрофными метаногенами, однако, сродство гомоацетогенов к водороду существенно ниже и их активность в сбалансированном метаногенном сообществе достаточно мала (Schink, 1997).

2.4 Метаногенная стадия

Сложный процесс распада ОВ в анаэробных условиях завершают метанобразующие археи. Они являются строгими анаэробами, окислительно-восстановительный потенциал среды для их роста составляет -330 мВ и ниже. Среди метаногенов встречаются психрофильные, мезофильные, термофильные, галофильные и ацидофильные виды. Средой обитания для метаногенов являются морские и пресноводные донные осадки, желудочно-кишечный тракт животных, в том числе человека, рисовые поля, болота, затопленные почвы, анаэробные биореакторы, полигоны ТБО, навозохранилища и другие природные и антропогенные экосистемы (Liu, Whitman, 2008; Brauer et al., 2011; Каллистова и др., 2017; Enzmann et al., 2018).

Метаногены считаются достаточно хорошо изученной группой микроорганизмов. Тем не менее, представления о типах метаногенеза, разнообразии и филогении метаногенных архей в последние годы существенно расширились. В течение многих лет считалось, что все известные метаногены относятся типу *Euryarchaeota* (домен *Archaea*). Однако открытия последних лет опровергают это утверждение. Развитие молекулярных методов позволило обнаружить и охарактеризовать несколько новых таксономических групп метаногенных архей, в том числе не относящихся к эвриархеям.

В настоящее время метаногенные археи представлены следующими семействами, относящимися к типу *Euryarchaeota*: *Methanococcales*, *Methanobacteriales*, *Methanosarcinales*, *Methanomicrobiales*, *Methanopyrales* и *Methanocellales* (Lui, Whitman, 2008; Sakai et al., 2008; Enzman et al., 2018). Также к эвриархеям относятся семейство *Methanomassiliicoccales*, представленное в настоящее время одним культивируемым видом *Methanomassiliicoccus luminyensis*, выделенным из кала человека, а также несколькими видами-кандидатами: *Candidatus* "M. intestinalis", *Ca.* "Methanomethylophilus alvus", *Ca.* "Methanogranum caenicola", *Ca.* "Methanoplasma termitum", филогенетически близким к представителям класса *Thermoplasmata* (Dridi et al., 2012; Iino et al., 2013; Lang et al., 2015).

В 2016 г. на основе метагеномных исследований был предложен новый класс метаногенов, относящихся к типу *Euryarchaeota*, – "*Ca.* Methanofastidiosa" (класс WSA2), представленный видом *Ca.* "Methanofastidiosum methylthiophilus" (Nobu et al., 2016). Отличительной особенностью метаногенов, относящихся к классу WSA2, является их уникальная субстратная специфичность – в качестве субстрата для метаногенеза может быть использован исключительно метилированный тиол, а также отсутствие большинства генов, кодирующих ферменты метаногенеза (Nobu et al., 2016). Тем не менее, согласно данным метагеномного анализа представители класса WSA2 широко распространены в природных и антропогенных системах (Nobu et al., 2016).

В 2017 г. был описан новый класс экстремально гало(алкали)фильных метаногенных архей "Methanonatronarchaeia", представленный культивируемыми видами *Ca.* "Methanonatronarchaeum thermophilum" и *Ca.* "Methanohalarchaeum thermophilum", филогенетически родственных представителям неметаногенных *Halobacteria*. Особенностью этих видов метаногенов является отсутствие осмопротекторов, при этом для сохранения гомеостаза происходит накопление ионов калия внутри клетки (Sorokin et al., 2017).

На основании анализа метагеномных данных были предложены 2 новых филума метаногенных архей, не относящихся к *Euryarchaeota*: "*Ca.* Bathyarchaeota" (Evans et al., 2015) и "*Ca.* Verstraetearchaeota" (*Ca.* "Methanomethylicus mesodigestum", *Ca.* "M. oleusabulum" ("Methanomethylicus" и *Ca.* "Methanosuratus petracarbonis") (Vanwonterghem et al. 2016). Гены представителей филума "*Ca.* Bathyarchaeota" наиболее часто встречаются в осадках пресноводных и соленых водоемов, а гены представителей филума "*Ca.* Verstraetearchaeota" были обнаружены в анаэробных реакторах и водах угольных шахт (Evans et al. 2015; Vanwonterghem et al. 2016).

Стоит отметить, что представители "*Ca.* Methanofastidiosa", "*Ca.* Bathyarchaeota" и "*Ca.* Verstraetearchaeota" являются некультивируемыми и предположения о способности представителей этих таксонов к метаногенезу основаны исключительно на присутствии генов,

кодирующих ключевые ферменты пути образования метана. Тем не менее, открытие новых типов метаногенных архей ставит под сомнение устоявшиеся представления о развитии метаногенеза, как уникальной черты типа *Euryarchaeota*, и позволяет предположить дальнейшие открытия новых ветвей метаногенов и, возможно, новых путей образования метана (Vanwonterghem et al. 2016; Enzman et al., 2018).

Метаногены обладают уникальным метаболизмом и рядом специфических коферментов, осуществляющих перенос C1-групп (метанофуран (MFR), тетрагидрометанооптерин (H₄MPT), коэнзим M (CoM-SH) и являющихся донорами электронов (ферредоксин (Fd), F₄₂₀, коэнзим B (CoB-SH)) (Lui, Whitman, 2008). В настоящее время описано 4 основных пути метаногенеза в зависимости от используемых субстратов и механизмов образования метана: 1) гидрогенотрофный (смесь H₂ и CO₂, формиат), 2) ацетокластический (ацетат, C2-соединения), 3) метилотрофный (метанол, метилированные амины и некоторые другие C1-соединения) и 4) метил-редуцирующий (метанол и метилированные C1-соединения вместе с H₂) (Каллистова и др., 2017; Lang et al., 2015; Schnurer, 2016; Sorokin et al., 2017; Enzman et al., 2018). В зависимости от используемого субстрата и наличия/отсутствия цитохромов механизмы образования метана различаются (табл. 6).

Таблица 6. Основные реакции образования метана (Lui, Whitman, 2008; Mayumi et al., 2016).

Уравнения реакций	ΔG^0 , кДж/моль CH ₄
Ацетокластический метаногенез $\text{CH}_3\text{COOH} \rightarrow \text{CH}_4 + \text{CO}_2$	-33
Гидрогенотрофный метаногенез $4 \text{H}_2 + \text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2 \text{H}_2\text{O}$	-135
Формиат-зависимый метаногенез $4 \text{HCOOH} \rightarrow \text{CH}_4 + 3 \text{CO}_2 + 2 \text{H}_2\text{O}$	-130
Образование метана из окиси углерода $4 \text{CO} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_4 + 3 \text{CO}_2$	-196
Метилотрофный метаногенез $4 \text{CH}_3\text{OH} \rightarrow 3 \text{CH}_4 + \text{CO}_2 + 2 \text{H}_2\text{O}$	-105
$2 (\text{CH}_3)_2\text{-S} + 2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 3 \text{CH}_4 + \text{CO}_2 + 2 \text{H}_2\text{S}$	-49
$4 \text{CH}_3\text{-NH}_2 + 2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 3 \text{CH}_4 + \text{CO}_2 + 4 \text{NH}_3$	-75
$2 (\text{CH}_3)_2\text{-NH} + 2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 3 \text{CH}_4 + \text{CO}_2 + 2 \text{NH}_3$	-73
$4 (\text{CH}_3)_3\text{-N} + 6 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 9 \text{CH}_4 + 3 \text{CO}_2 + 4 \text{NH}_3$	-74
$4 \text{CH}_3\text{NH}_3\text{Cl} + 2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 3 \text{CH}_4 + \text{CO}_2 + 4 \text{NH}_4\text{Cl}$	-113
$\text{CH}_3\text{OH} + \text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + \text{H}_2\text{O}$	
Метоксидотрофный метаногенез $4\text{Ar-OCH}_3 + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 4\text{Ar-OH} + 3\text{CH}_4 + \text{CO}_2$	н.д.

Гидрогенотрофные метаногены используют CO₂ в качестве субстрата и H₂ в качестве донора электронов (Lui, Whitman, 2008; Schnurer, 2016). Процесс восстановления CO₂ в метан

состоит из нескольких этапов. Сначала происходит восстановление и активация CO_2 до формилметанофурана (CHO-MFR) с образованием формильной группы, при этом донором электронов выступает ферредоксин (Fd) (Enzman et al., 2018). Затем формильная группа переносится на тетрагидрометаноптерин (H_4MPT) с образованием формил- H_4MTP , после чего происходит ее дегидрирование и восстановлением с образованием сначала метилен- H_4MTP , а затем метил- H_4MTP с использованием восстановленного кофермента F_{420}H_2 в качестве донора электронов. Следующим этапом является перенос метильной группы на коэнзим M с образованием метил- CoM-SH . Последний этап является универсальным для любого из механизмов метаногенеза – это взаимодействие метил- CoM с коферментом B (CoB-SH), в результате которого образуется метан и гетеродисульфид (CoM-S-S-CoB), который затем восстанавливается водородом, что приводит к возвращению коферментов в цикл (Liu, Whitman, 2008; Thauer et al., 2008; Enzman et al., 2018). В процессе участвуют 2 гидрогеназных комплекса, один из которых – связанный с мембраной энергопреобразующий гидрогеназный комплекс (Eha), участвует в восстановлении Fd водородом и встречается у всех метаногенов, не имеющих цитохромов, другой – комплекс из железо-никелевой цитоплазматической гидрогеназы (MvhADG) и гетеродисульфидредуктазы (HdrABC) обеспечивает восстановление Fd и CoM-S-S-CoB (Thauer et al., 2008; Каллистова и др., 2017).

Формиат также может быть использован в качестве донора электрона за счет внутриклеточного преобразования в водород путем формиат-лиазной реакции (Каллистова и др., 2017; Lui, Whitman, 2008). В этом случае путь метаногенеза иногда называют формиат-зависимым.

К гидрогенотрофным метаногенам относится большинство представителей порядков *Methanobacteriales*, *Methanomicrobiales*, *Methanococcales*, *Methanopyrales* и *Methanocellales*. Роль гидрогенотрофных метаногенов в анаэробных сообществах сложно переоценить. Они являются основными партнерами синтрофных бактерий и обеспечивают принципиальную энергетическую возможность осуществления синтрофии за счет потребления водорода (Каллистова и др., 2014; Schnurer, 2016).

Использовать ацетат в качестве субстрата для образования метана способны только представители родов *Methanosarcina* и *Methanothrix* (*Methanosaeta*) – **ацетокластические метаногены**. Для представителей рода *Methanothrix* ацетат является единственным утилизируемым субстратом, к которому они проявляют очень высокое сродство – концентрация ацетата в 7–70 мкмоль/л является достаточной для поддержания роста метанотрикса (Welte, Deprenmeier, 2014). Представители рода *Methanosarcina* обладают самым широким спектром утилизируемых субстратов: метаносарцины активно используют ацетат, различные метилированные C1-соединения, а также смесь H_2 и CO_2 и H_2 и CO (Liu, Whitman, 2008; Welte,

Deppenmeier, 2014; Enzman et al., 2018). Разнообразные метаболические способности и физиологическая адаптивность связаны с увеличенным размером генома метаносарцин, который в два и более раза превышает средний размер генома других метаногенов (Welte, Deppenmeier, 2014).

Ацетокластические метаногены обладают уникальными коферментами: тетрагидросарциноптерин (H_4STP), коэнзим F_{300} и метанофеназин (Mph) (Welte, Deppenmeier, 2014). Кроме того, представители порядка *Methanosarcinales* имеют цитохромы, наличие которых позволяет получать энергию с помощью мембрансвязанной электрон-транспортной цепи, что позволяет существенно повысить эффективность метаболизма (Liu, Whitman, 2008; Welte, Deppenmeier, 2014; Каллистова и др., 2017).

Первым этапом ацетокластического пути образования метана является активация молекулы ацетата, а именно его карбоксильной группы. У представителей рода *Methanosarcina* активация ацетата осуществляется в две стадии: сначала происходит АТФ-зависимая фосфорилиция карбоксильной группы с помощью ацетаткиназы, а затем образование ацетил-СоА с помощью фосфотрансацетилазы (Ferry, 2011). Активация ацетата у представителей рода *Methanoxthrix* осуществляется с помощью обладающей высоким сродством к субстрату ацетил-СоА-синтазы с затратой энергии гидролиза пиррофосфата в один этап, что обеспечивает преимущество *Methanoxthrix* при низких концентрациях ацетата в среде (Welte, Deppenmeier, 2014; Каллистова и др., 2017).

Дальнейшее преобразование ацетил-СоА осуществляется с помощью комплекса ферментов СО-дегидрогеназы и ацетил-СоА-синтазы (Cdh-комплекс), в результате активности которых метильная группа передается на H_4STP (образуется метил- H_4STP), а карбонильная группа окисляется до CO_2 с передачей электронов на Fd (Ferry, 2011; Welte, Deppenmeier, 2014). Заключительная реакция ацетокластического пути образования метана совпадает с таковой у гидрогенотрофных метаногенов.

Метилотрофные метаногены способны использовать метанол, метиламины, метилированные соединения серы. Большинство метилотрофных метаногенов относится к порядку *Methanosarcinales* (*Methanomethylovorans*, *Methanohalophilus*, *Methanohalobium*, *Methanosarcina thermophila* и др.) (Liu, Whitman, 2008; Enzman et al., 2018). Процесс образования метана по метилотрофному пути начинается с активации и переноса метильных групп с соответствующих субстратов с помощью специфических метилтрансфераз с последующим формированием метил-СоМ-SH (Enzman et al., 2018). Дальнейшие реакции совпадают. Большинство метилотрофных метаногенов получают энергию, необходимую для синтеза метана, используя окисление дополнительной метильной группы до CO_2 в ходе повернутых в противоположном направлении реакций гидрогенотрофного пути

(диспропорционирование) (Liu, Whitman, 2008; Каллистова и др., 2017). Метилотрофные метаногены играют большую роль в соленых и обогащенных сульфатом экосистемах, т.к. они не конкурируют с сульфатредуцирующими бактериями за субстрат (Sorokin et al., 2015). В местообитаниях, где происходит активное анаэробное разложение древесных остатков, в результате которого выделяется большое количество метилированных соединений, также накапливаются метилотрофные метаногены.

Метил-редуцирующие метаногены отличаются от метилотрофных тем, что при использовании метильных соединений они нуждаются в присутствии водорода или формиата для получения электронов. Причиной этого является отсутствие у метил-редуцирующих метаногенов способности к диспропорционированию метильных групп, что связано с частичным или полным отсутствием необходимых генов или их неактивностью (Каллистова и др., 2017; Sorokin et al., 2017).

Изучение метил-редуцирующих метаногенов активно развивается. На текущий момент известно, что метаногенез путем метилредукции осуществляют *Methanomicrococcus blatticola* (порядок *Methanosarcinales*) и *Methanosphaera stadtmanae* (порядок *Methanobacteriales*), представители порядка *Methanomassiliicoccales*, а также представители недавно открытого класса *Ca. "Methanonatronarchaeia"* (Lang et al., 2015; Каллистова и др., 2017; Sorokin et al., 2017). На основании геномных исследований к метил-редуцирующим метаногенам относятся также представители нескольких новых некультивируемых групп метаногенов, а именно "*Ca. Methanofastidiosa*" (WSA2, филум *Euryarchaeota*), "*Ca. Bathyarchaeota*", "*Ca. Verstraetearchaeota*" (*Ca. "Methanomethylicus"*, *Ca. "Methanosuratus"*) (Каллистова и др., 2017; Sorokin et al., 2017).

В 2016 г. был обнаружен метаноген *Methermicoccus shengliensis*, способный использовать метоксилированные ароматические соединения каменного угля (2-метоксибензоат, 3,4,5-триметоксибензоат, 1,2,3-триметоксибензен и т.д.) для синтеза метана. Этот процесс получил предварительное название **метоксидотрофного метаногенеза**. Механизмы его пока недостаточно изучены, но предполагается, что образование метана происходит в соответствие с уравнением: $4Ar-OCH_3 + 2H_2O \rightarrow 4Ar-OH + 3CH_4 + CO_2$, где Ar – ароматическая часть молекулы (Maayumi et al., 2016).

В природных экосистемах до 70% метана образуется из ацетата и менее 30% из водорода и CO₂ (Ferry, 2011). Наименьший вклад в образование метана вносят метанол и метилированные соединения (Ferry, 2011). Однако при изменении условий, например, повышение температуры, высокие концентрации ОВ (в антропогенных системах), накопление ингибирующих веществ (аммоний, ЛЖК), вклад различных групп метаногенов в общую продукцию метана может изменяться (Nozhevnikova et al., 2007; Но et al., 2013).

Таким образом, разложение ОВ в анаэробных условиях с микробиологической точки зрения представляет собой сложный многоступенчатый процесс, в котором задействованы разнообразные микроорганизмы, метаболически и филогенетически отличающиеся друг от друга. Трофические связи, реализуемые в сообществе, делают возможным трансформацию соединений, недоступную индивидуальным микроорганизмам. Синтрофные бактерии и метаногенные археи относятся к наиболее чувствительным группам метаногенного сообщества. Изучение жизнедеятельности микроорганизмов сообщества имеет ключевое значение для разработки способов оптимизации процесса анаэробного сбраживания отходов.

ЧАСТЬ 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Глава 3. Объекты и методы исследования, постановка экспериментов

3.1 Субстраты

В качестве субстратов использовали: модель органической фракции ТБО и пищевые отходы, избыточный активный ил и модель первичного осадка сточных вод.

В качестве *модели ОФ-ТБО* использовали смесь комбикорма СК–8, богатого доступным ОВ, и целлюлозосодержащего компонента (низкокачественная туалетная бумага). В состав комбикорма СК–8 входят ячмень, пшеница, отруби пшеничные, мучка пшеничная, шрот подсолнечный, солодовые ростки, жмых рапсовый и др. Согласно данным производителя сырой протеин составляет 14,5%, углеводы (крахмал) – 35,5%, сырые липиды – 2,3%, клетчатка – 9%, прочие органические соединения – 40%. Для получения модельной ОФ-ТБО смешивали комбикорм, туалетную бумагу и водопроводную воду в соотношении 2 : 0,2 : 15 по весу.

Пищевые отходы (ПО) представляли собой отходы, собранные в домашних условиях, или ПО столовой, при этом собственно остатки продуктов (фруктовые и овощные очистки, хлеб, крупы, мясные остатки и т.д.) составляли 96%, биоразлагаемый упаковочный материал (газеты, салфетки, картонные упаковки) – 4%. Для приготовления ПО все компоненты тщательно измельчали с помощью блендера и увлажняли дистиллированной водой.

Уплотненный избыточный активный ил аэротенка (АИ) Курьяновской станции очистки сточных вод (г. Москва) при необходимости дополнительно обезвоживали путем центрифугирования до влажности 92%.

Нативный первичный осадок не может быть использован в работе согласно санитарно-гигиеническим правилам ФИЦ Биотехнологии РАН из-за присутствия в нем патогенных микроорганизмов и яиц гельминтов. В качестве модели первичного ОСВ был выбран корм для собак «Чаппи» (Mars Petcare, Россия), обладающий схожим составом питательных веществ. Сравнение состава нативного и модельного первичного осадка представлено в таблице 7.

Таблица 7. Состав нативного и модельного (корм для собак Чаппи) первичного осадка (% от сухого вещества).

Компонент	Первичный осадок	Корм для собак Чаппи*
Белки	20–30	20
Жиры	8–21	11
Целлюлоза (клетчатка)	8–20	8
Органическое в-во (ОВ)	73–80	85

* согласно информации, указанной производителем на упаковке.

Непосредственно перед использованием корм для собак измельчали с помощью пестика и ступки, затем разбавляли дистиллированной водой до требуемой влажности (92–93%).

3.2 Инокуляты

В качестве источников анаэробных микроорганизмов для запуска процесса использовали различные инокуляты: уплотненный сброженный осадок, суспензии, приготовленные из кека и грунта полигона ТБО.

Источником *уплотненного анаэробно сброженного ОСВ* (Упл. ил) служил термофильный метантенк Курьяновской станции очистки сточных вод (г. Москва), в котором обрабатывается смесь первичного и вторичного ОСВ в соотношении около 1:1.

Механически обезвоженный анаэробно сброженный ОСВ (кек) (Пресс. Ил) получали из термофильного метантенка Люберецкой станции очистки сточных вод (г. Москва). Суспензию готовили путем добавления к навеске кека дистиллированной воды (1:1) и тщательного перемешивания.

Суспензию, приготовленную из грунта анаэробной зоны полигона ТБО (Грунт ТБО), получали путем разведения навески почвы грунта полигона ТБО, предварительно растертой в ступке, в холодной кипяченной дистиллированной воде (1:2 по весу). Полученную суспензию активировали путем добавления кристаллической целлюлозы (4,5 г/л) и мясопептонного бульона (90 мл/л) и инкубирования в анаэробных условиях при 50°C. Степень активизации микробного сообщества оценивали по увеличению содержания метана в газовой фазе флаконов.

3.3 Ко-ферментация пищевых отходов и избыточного активного ила в периодическом режиме

В качестве субстратов использовали смесь пищевых отходов и избыточного активного ила в соотношении 80/20% по ОВ. В качестве инокулятов использовали: 1) уплотненный сброженный осадок (Упл. Ил); 2) суспензию, приготовленную из прессованного сброженного осадка (Пресс. Ил); 3) суспензию, приготовленную из грунта полигона ТБО (Грунт ТБО). Количество инокулята в исходной смеси составляло 10–20% в расчете на суммарное ОВ сбрасываемой смеси. Инокуляты предварительно активировали путем инкубации при 50°C с добавлением 3 г/л ацетата натрия. Исходная влажность составляла 92–93%. Все образцы были в трех повторностях. В табл. 8 представлена схема эксперимента.

Компоненты вносили под током аргона, объем смесей доводили до 240 мл 0,1М фосфатным буфером. Смеси инкубировали при 50°C, регулярно измеряя состав газовой фазы, рН и концентрацию ЛЖК в жидкой фазе. В начале и в конце экспериментов измеряли содержание СВ и ОВ.

Таблица 8. Схема эксперимента по анаэробной ко-ферментации пищевых отходов и осадков сточных вод.

Состав смеси	Субстраты		Инокуляты			Общий объем смеси, мл
	ПО, г	Активный ил, мл	Грунт ТБО, мл	Упл. ил, мл	Пресс. ил, мл	
Субстрат + буфер (Контроль)	40	150	–	–	–	240
Субстрат + Грунт ТБО	40	150	50	–	–	240
Субстрат + Упл. ил	40	150	–	50	–	240
Субстрат + Пресс. ил	40	150	–	–	50	240
Субстрат + Грунт ТБО + Упл. ил	40	150	25	25	–	240
Субстрат + Грунт ТБО + Пресс. ил	40	150	25	–	25	240

3.4 Изучение влияния флокулянта на термофильное сбраживание осадков сточных вод в периодическом режиме

В качестве инокулята использовали уплотненный термофильно сброженный осадок. В качестве субстратов использовали уплотненный избыточный активный ил и модельный первичный осадок. Соотношение избыточного активного ила и модельного первичного осадка (далее – первичного осадка) в субстратной смеси составляло 1/1 по ОВ. Избыточный активный ил и сброженный осадок уплотняли до влажности 92–93% путем центрифугирования (5 мин., 4500 об/мин). Влажность сбраживаемой смеси составляла 92–93%. В таблице 9 представлены некоторые характеристики использованных субстратов и инокулята.

В качестве флокулянта использовали катионный полиакриамидный флокулянт Праэстол 650 (ПАА) (Ashland, Германия), который используется на очистных сооружениях в России. В экспериментальные смеси ПАА добавляли в виде 1%-ного водного раствора, для получения которого 1 г сухого флокулянта разводили в 99 мл дистиллированной воды и аккуратно перемешивали на качалке в течение часа.

Таблица 9. Характеристики инокулята и субстратов, использованных в эксперименте.

Компонент сбраживаемой смеси	Параметр		
	Сухое вещество, г/кг	Органическое вещество, г/кг	pH
Сброженный осадок (инокулят)	48,6±0,1	20,5±0,1	7,8
Уплотненный активный ил	13,4±0,1	8,0±0,1	7,3
Модельный первичный осадок (корм для собак «Чаппи»)	905,5±0,2	846,8±0,9	5,1*

* При разбавлении дистиллированной водой в 10 раз.

Все эксперименты, за исключением эксперимента 2, проводили в термофильных условиях (50±0,5°C) в стеклянных флаконах объемом 500 мл, объем сбраживаемой смеси составлял 100

мл. Эксперимент 2 проводили во флаконах объемом 120 мл с объемом сброживаемой смеси 50 мл. Для создания анаэробных условий бутылки продували азотом и закупоривали резиновыми пробками и алюминиевыми крышками.

Эксперимент 1 проводили для определения оптимального соотношения инокулята к субстрату (И/С) для запуска процесса сброживания высокоуплотненных ОСВ. Для этого исследовали смеси со следующими соотношениями И/С (по ОБ): 10/90, 25/75, 40/60, 55/45, 70/30 и 100/0 (контроль) (табл. 10).

Таблица 10. Исходные характеристики сброживаемых смесей в экспериментах 1, 3 и 4.

Параметр	Эксперимент 1					Эксперимент 3	Эксперимент 4
	И/С 25/75	И/С 40/60	И/С 55/45	И/С 70/30	И/С 100/0	ПАА 0–40	ПАА 0–40
Сухое вещество (СВ), мг/г	80,1±0,1					79,7±0,2	80,3±0,2
Органическое вещество (ОБ), мг/г	54,6	51,8	49,5	46,9	42,6	49,3±0,1	52,0±0,1
Соотношение И/С,% ОБ/% ОБ	25/75	40/60	55/45	70/30	100/0	60/40	40/60
Концентрация флокулянта, мг/г СВ	0					0, 5, 15, 30 и 40	
рН	7,38±0,04					7,46±0,02	7,34±0,02
Концентрация ЛЖК, г/л в экв. ацетата	0,96	0,95	1,09	0,98	0,65	0,93±0,07	0,83±0,04
Общий аммонийный азот, мг N-NH ₄ /л	432	387	375	450	456	502±37	450±36

В **эксперименте 2** изучали биоразлагаемость и токсичность ПАА–флокулянта в анаэробных условиях. Во флаконы объемом 120 мл вносили уплотненный сброженный осадок (3 г) и жидкую среду (минеральный фон + растворы микроэлементов и витаминов) до 50 мл. В часть флаконов (серия Т – исследование токсичности) в качестве субстратов вносили смесь ацетата, пропионата и бутирата в концентрациях 60, 10 и 30 мМ, соответственно. Образцы, в которые вносили только среду без субстратов, обозначали как образцы серии Б (изучение биodeградability). Далее во все образцы добавляли навески флокулянта до конечных концентраций 5, 40, 80, 200 и 400 мг/г СВ. Эксперимент продолжали в течение 40 сут в соответствии с методикой Кампос с соавт. (Campos et al., 2008).

В **эксперименте 3** исследовали влияние различных концентраций катионного ПАА флокулянта на процесс анаэробного сброживания ОСВ с оптимальным соотношением И/С, равным 55/45. Для этого сброженный осадок смешивали с избыточным активным илом и первичным осадком в соотношении 55, 22,5 и 22,5% от общего ОБ смеси, соответственно. Концентрация флокулянта составляла: 5, 15, 30 и 40 мг/г СВ сброживаемой смеси (табл. 10).

В *эксперименте 4* изучали влияние различных концентраций флокулянта на процесс анаэробного сбраживания ОСВ при сниженном соотношении И/С, равном 40/60. При этом соотношение сброженного осадка, избыточного активного ила и первичного осадка составляло 40, 30 и 30% от общего ОВ смеси, соответственно. Концентрации флокулянта составляли 5, 15, 30 и 40 мг/г СВ сбраживаемой смеси (табл. 10).

В *эксперименте 5* изучали возможность использования флокулянта для восстановления метаногенеза в реакторе, дестабилизированном в связи с накоплением высокой концентрации ЛЖК. Сниженное количество инокулята (30% от общего ОВ смеси) и увеличенное количество модельного первичного осадка (45% от общего ОВ смеси) способствовало накоплению избытка ЛЖК, снижению рН и прекращению образования метана. Через 7 сут в бутылки вносили раствор флокулянта до конечных концентраций 20, 40 и 60 мг ПАА/г СВ. В контрольные бутылки, а также в бутылки с концентрацией 20 и 40 мг ПАА/г СВ вносили воду так, чтобы объем сбраживаемой смеси оставался одинаковым во всех образцах. Часть смесей оставляли в стационарных условиях, часть инкубировали при перемешивании (100 об/мин).

Во всех экспериментах регулярно измеряли состав газовой фазы (CH_4 , CO_2 , H_2), жидкой фазы (ЛЖК, спирты, ОАА), рН. В начале и в конце экспериментов определяли содержание СВ и ОВ.

3.5 Эксперименты в лабораторном реакторе при непрерывном режиме сбраживания

В качестве субстратов для анаэробной ферментации использовали ОСВ, ПО и модельную ОФ-ТБО. ОСВ представляли собой смесь первичного и вторичного осадков Люберецких очистных сооружений в соотношении 1:1 по объему. Порции ОСВ из очистных сооружений отбирали 1 раз в 2 недели и до использования хранили при 4°C. При необходимости ОСВ уплотняли с использованием лабораторной центрифуги при 5000 об/мин в течение 5 мин.

В качестве второго субстрата для запуска реактора использовали ПО столовой (табл. 11), состав которых в значительной степени варьировал в зависимости от меню столовой.

Таблица 11. Примерный состав пищевых отходов столовой.

Компонент отходов	Доля по весу, %
Овощные очистки	50
Остатки хлебных изделий и круп	25
Остатки мясных продуктов и кости	10
Бумага	10
Остатки молочных продуктов	5

Для дальнейших экспериментов с целью унификации состава в качестве дополнительного субстрата использовали модельную ОФ-ТБО, состоящую из целлюлозосодержащего компонента (неотбеленная туалетная бумага) и комбикорма СК-8, богатого доступным ОВ.

Характеристика исходных субстратов для анаэробной ко-ферментации ОСВ и ОФ-ТБО представлена в табл. 12.

Таблица 12. Характеристика исходных субстратов для анаэробной ко-ферментации ОСВ и ОФ-ТБО.

Показатель	Единица измерения	Субстрат		
		Нативный ОСВ	Уплотненный ОСВ	Модельная ОФ-ТБО
рН		6,9	6,9	4,8
Влажность	%	94,7	90,5	88,4
ОВ/СВ	%	63,8	63,4	87,4
Белки	% от ОВ	35,0	35,0	11,2
Жиры	% от ОВ	24,6	24,6	1,8
Углеводы	% от ОВ	11,6	11,6	43,1

В качестве инокулята для биогазовой установки использовали уплотненный термофильно сброженный ОСВ.

Конструкция лабораторного биогазового реактора, работающего в непрерывном режиме.

Лабораторный анаэробный реактор был сконструирован в рамках выполнения работ по федеральному целевому проекту Минобрнауки РФ, идентификационный номер RFMEFI60417X0190, исполнителями проекта Ковалевым Д.А. и Ковалевым А.А. и располагался на территории Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный агроинженерный центр ВИМ» (ФГБНУ ФНАЦ ВИМ). Внешний вид и общая схема лабораторного биореактора представлены на рис. 3. Реактор включал следующие основные узлы: измельчитель, реактор предварительной обработки, метантенк, отстойник для сброженной массы и газгольдер, выполненные из нержавеющей стали. Загрузка метантенка осуществлялась 1 раз в сут. Для этого смесь ОФ-ТБО (ПО), ОСВ и воды подавали в измельчитель, а затем в реактор предварительной обработки, где в течение 30 мин при постоянном перемешивании происходила гомогенизация и подогрев смеси до рабочей температуры ($55 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$). Подготовленная смесь в течение 10 сек поступала в метантенк с помощью насоса-дозатора, при этом сброженная масса самотеком вытеснялась в отстойник для сброженной биомассы. Примесь свежей смеси в отстойнике не превышала 3%. Перемешивание сбрасываемой смеси в метантенке осуществлялось в течение 1 мин каждые 10 мин. Образующийся биогаз собирался в газгольдере. Объем биогаза определяли по высоте поднятия

колокола газгольдера. Ежедневно после добавления очередной порции субстрата газгольдер опустошали, сжигая биогаз в газовой горелке. Технические характеристики биогазовой установки представлены в табл. 13.

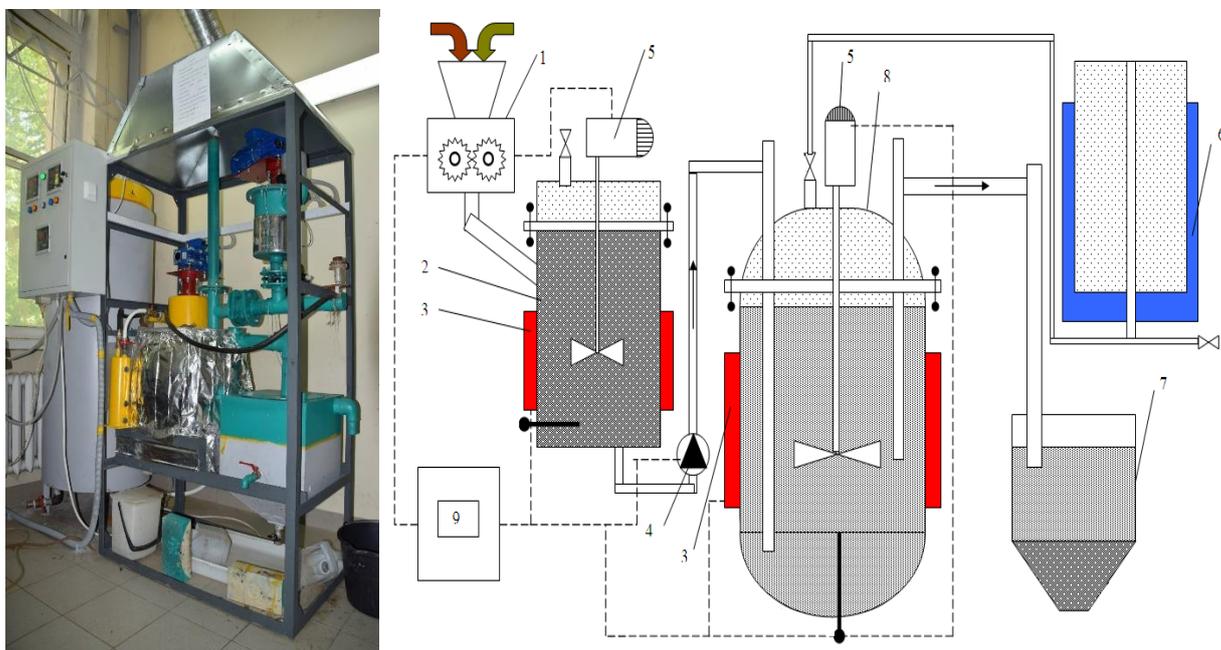


Рис. 3. Общий вид (слева) и схема (справа) анаэробного биогазового реактора: 1 – измельчитель; 2 – реактор предварительной обработки; 3 – нагреватель; 4 – насос-дозатор; 5 – устройство перемешивания; 6 – газгольдер; 7 – отстойник для сброженной биомассы; 8 – метантенк; 9 – блок управления.

Таблица 13. Технические характеристики лабораторного биогазового реактора.

Показатель, единицы измерения	Значение
Объем реактора предварительной обработки, м ³	0,008
Объем метантенка, м ³	0,05
Объем газгольдера, м ³	0,3
Объем отстойника для сброженной биомассы, м ³	0,08
Число оборотов мешалки реактора предварительной обработки, об мин ⁻¹	240
Число оборотов мешалки метантенка, об мин ⁻¹	40
Температура процесса, °С	55
Давление биогаза в газгольдере, мм вод. ст.	100

Постановка и проведение экспериментов в биогазовом реакторе

Запуск и работу на биогазовом реакторе осуществляли сотрудники ФГБНУ ФНАЦ ВИМ Д.А. Ковалев и А.А. Ковалев. Для запуска биогазового реактора весь объем метантенка заполняли инокулятом и выдерживали в течение недели при рабочей температуре (55°С) без добавления субстрата. Затем начали добавлять субстратную смесь ОСВ и ПО, постепенно увеличивая долю ПО с 0 до 40% по весу.

Перевод реактора на сбраживание смеси ОСВ и модельной ОФ-ТБО проводили в последовательности, указанной в таблице 14. Соотношение ОСВ и ОФ-ТБО в смесях составляло 100/0, 75/25, 50/50, 25/75 и 0/100 по сухому веществу. Каждое соотношение, кроме 100/0 (только ОСВ), исследовали при различной нагрузке: низкой (3,2–4,4 кг ОВ/ м³ сут), средней (5,2–6,6 кг ОВ/ м³ сут) и высокой (6,9–8,7 кг ОВ/ м³ сут) нагрузке, влажность исходной смеси при этом составляла 95, 92,5 и 90%, соответственно. Время удержания на всех этапах эксперимента составляло 10 сут, что считается оптимумом для разложения ОВ отходов в полупериодических и непрерывных процессах термофильного сбраживания, а также препятствует вымыванию метаногенных микроорганизмов (Appels et al., 2008).

Таблица 14. Исходные параметры проведения процесса анаэробной ко-ферментации ОСВ и ОФ-ТБО.

№ этапа	Соотношение ОСВ/ОФ-ТБО (по СВ)	Содержание СВ, %	Содержание ОВ, %	Нагрузка по ОВ (OLR), кг ОВ/(м ³ сут)
1	100 : 0	5,00	3,19	3,19
2	75 : 25	5,00	3,49	3,49
3		7,51	5,21	5,23
4		9,95	6,91	6,97
5	50 : 50	5,00	3,78	3,78
6		7,52	5,67	5,67
7		10,03	7,56	7,56
8	25 : 75	5,00	4,08	4,08
9		7,50	6,11	6,11
10		10,01	8,15	8,15
11	0 : 100	5,00	4,37	4,37
12		7,50	6,56	6,56
13		10,00	8,74	8,74

Объем биогаза и рН сброженной массы определяли ежедневно. Определение содержания СН₄ и СО₂ в биогазе, степени удаления СВ и ОВ, а также содержание ЛЖК, щелочности и аммонийного азота в жидкой фракции сброженной массы проводили регулярно с периодичностью 1 раз в 2–3 сут. Перечисленные исследования проводились автором на территории Института микробиологии им. С.Н. Виноградского ФИЦ Биотехнологии РАН.

3.6 Микробиологические методы

3.6.1 Среда для культивирования

Для получения накопительных и чистых культур метаногенных архей и синтрофных бактерий использовали жидкую модифицированную среду Пфеннига (Pfennig, 1965). Основой для среды Пфеннига являлся минеральный фон, состоящий из концентрированного раствора 1 (10 мл/л) и концентрированного раствора 2 (10 мл/л). В состав концентрированного раствора 1 входили следующие компоненты: NH_4Cl – 33 г/л, $\text{MgCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (или $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) – 33 (50) г/л, $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 33 г/л, KCl – 33 г/л. В состав концентрированного раствора 2 входил KH_2PO_4 – 33 г/л. К минеральному фону добавляли раствор микроэлементов по Липперту (Pfenning, Lippert, 1966) (2 мл/л) и раствор витаминов по Волину (Wolin, Wolin, 1963) (2 мл/л) (табл. 15). В качестве дополнительного источника необходимых для анаэробных микроорганизмов факторов роста вносили дрожжевой экстракт (0,2–1,0 г/л).

Таблица 15. Состав раствора микроэлементов по Липперту и раствор витаминов по Волину.

Раствор микроэлементов по Липперту		Раствор витаминов по Волину	
Компонент	Концентрация, мг/ 100 мл дистиллированной воды	Компонент	Концентрация, мг/ 100 мл дистиллированной воды
Трилон Б	500	Биотин	2
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	200	Фолиевая кислота	2
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10	Пиридоксин гидрохлорид (B_6)	10
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	3	Рибофлавин (B_2)	5
H_3BO_3	30	Тиамин (B_1)	5
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	20	Никотиновая кислота (PP , B_3)	5
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1	Пантотеновая кислота (B_5)	5
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	4	Цианкобаламин (B_{12})	0,1
NaMoO_4	4	Пара-аминобензойная кислота	5
Na_2SeO_4	3	Липоевая кислота	5

В качестве индикатора анаэробных условий использовали раствор резазурина (1 мл/л). Для приготовления раствора растворяли 0,2 г твердого резазурина ($\text{C}_{12}\text{H}_6\text{NO}_4 \cdot \text{Na}$) в 20 мл раствора 0,1н NaOH и доводили до 500 мл дистиллированной водой. Для восстановления среды использовали сульфид натрия (0,6 г/л) и цистеин (0,5 г/л). Для поддержания буферной емкости добавляли гидрокарбонат натрия (1,5–2,5 г/л).

Среду Пфеннига готовили в несколько этапов. Среду с минеральным фоном и раствором резазурина кипятили не менее 10 мин для удаления растворенного кислорода. Затем помещали бутылку со средой в чашу с проточной холодной водой и охлаждали под током CO_2 . В процессе охлаждения добавляли раствор микроэлементов, раствор витаминов, соду и дрожжевой экстракт. В последнюю очередь добавляли сульфид натрия и цистеин, быстро закрывали бутылку с помощью анаэробного дозатора и оставляли среду для восстановления. Смена розовой окраски резазурина на бесцветную свидетельствовала о восстановлении среды, после чего ее разливали под током азота или аргона по флаконам с герметичными резиновыми пробками и алюминиевыми крышками. Если субстратом служила смесь H_2/CO_2 , то газовую фазу продували смесью H_2/CO_2 в процентном соотношении 80:20. Объем флаконов составлял 60 или 120 мл, объем среды – 18 и 36 мл соответственно. Среду стерилизовали при 1 атм. в течение 30–40 мин. Субстраты для роста метаногенных архей и синтрофных бактерий вносили в среду после стерилизации. Засев в количестве 10% об проводили после внесения растворов субстратов.

3.6.2 Субстраты для культивирования

Для культивирования различных групп метаногенных архей в качестве субстратов использовали ацетат натрия (20 мМ), метанол (20 мМ), газовую смесь H_2/CO_2 в соотношении 4:1, смесь метанола (10 мМ) и H_2/CO_2 , смесь формиата (10 мМ) и H_2/CO_2 , смесь триметиламина (10 мМ) и H_2/CO_2 .

Для выделения синтрофных бактерий и консорциумов, устойчивых к высоким концентрациям ЛЖК, в качестве субстратов использовали растворы ацетата натрия, пропионата натрия, бутирата натрия, кротоната и fumarата натрия в различных концентрациях (≥ 20 мМ).

Для накопления биомассы выделенной в чистую культуру бактерии и проведения физиологических экспериментов использовали сахарозу, глюкозу или фруктозу (20 мМ) с добавлением дрожжевого экстракта (1 г/л). Для определения спектра используемых бактерией субстратов использовали: целлобиозу, фруктозу, маннозу, галактозу, дрожжевой экстракт, сахарозу, глюкозу, ксилозу, рамнозу, цистеин, казаминовые кислоты, собрат, целлюлозу, ксилан, бутират, ацетат, пропионат, малат (5 мМ), метанол, этанол, пептон, раффинозу, рибозу, лактозу, арабинозу, лактат, мелибиозу, крахмал, глюкозамин, пируват, формиат, глицерин, кротонат, бетаин в концентрации 20 мМ, если другое не указано. В качестве возможных акцепторов электронов исследовали тиосульфат, сульфит, сульфат, дитионит и коллоидную серу.

Субстраты готовили в виде концентрированных растворов (1 М), которые стерилизовали при 1 атм 30–40 мин или методом фильтрования (сахара). Растворы хранили в холодильники при температуре 4°C.

3.6.3. Получение метаногенных консорциумов, адаптированных к высоким концентрациям летучих жирных кислот

Получение метаногенных консорциумов, устойчивых к высоким концентрациям ЛЖК. Накопительные культуры синтрофных бактерий и метаногенных архей получали из сброженного осадка на среде с пропионатом или бутиратом. После первого пересева накопительные культуры использовали в качестве инокулятов для получения синтрофных консорциумов, устойчивых к высоким концентрациям ЛЖК. Для этого концентрацию субстратов (пропионата и бутирата) последовательно увеличивали с 20 мМ до 200 мМ, субстраты использовали как отдельно, так и в смеси с добавлением того же количества ацетата натрия. Эксперименты проводили в бутылках объемом 500 мл, объем среды составлял 100 мл, объем инокулята 10–20%.

Применение метаногенных консорциумов, адаптированных к высоким концентрациям ЛЖК, в качестве дополнительного инокулята. Проверку активности полученных адаптированных к высокой концентрации ЛЖК консорциумов проводили в эксперименте по сбраживанию модельной ОФ-ТБО при разных исходных соотношениях инокулята к субстрату. В качестве основного инокулята использовали уплотненный сброженный осадок термофильного метантенка. Синтрофный консорциум получали при смешивании биомассы, накопленной в ходе предыдущих экспериментов в образцах с концентрацией бутирата 95 и 170 мМ, пропионата 60 и 95 мМ и смеси ЛЖК 40/30/30 мМ (по 25 мл). Было изучено два варианта сбраживаемых смесей, отличающихся соотношением количества И/С: 50/50 (оптимальное) и 20/80 (низкое, потенциально приводящее к закислению). Эксперименты проводили во флаконах объемом 120 мл, объем сбраживаемой смеси составлял 20 мл. В экспериментальные флаконы вносили 10 мл субстратной смеси и сброженного осадка в соотношении 50/50 или 20/80, затем добавляли 10 мл суспензии консорциумов, в контрольные образцы вносили 10 мл дистиллированной воды. Для создания анаэробных условий флаконы продували аргоном, закрывали плотными пробками и крышками. Инкубировали при 50°C в течение 30 сут. Регулярно измеряли состав газовой фазы, концентрацию ЛЖК и pH. Содержание сухого и органического вещества измеряли в начале и в конце эксперимента.

3.6.4 Выделение чистой культуры штамма SP2

Из полученных синтрофных консорциумов, устойчивых к высоким концентрациям бутирата, выделяли чистые культуры. Для этого использовали комплекс микробиологических методов: метод серийных разведений, высев на среды со специфическими ингибиторами роста, посев на различные субстраты, высев на твердую агаризованную среду для получения изолированных колоний, культивирование синтрофных бактерий с фоном метаногенов.

Метод серийных разведений. Принцип метода заключается в механическом пространственном разделении микроорганизмов в ходе серии последовательных разведений. Накопительную культуру последовательно пересевали в серию флаконов из 5–10 штук (разведение 10^{-6} – 10^{-11}), внося по 10% инокулята в каждый. Из последнего флакона, в котором был зафиксирован рост и образование метана или водорода, повторяли пересев на серию флаконов с жидкой средой или на твердую агаризованную среду.

Высев на среду со специфическими ингибиторами роста. Для выделения чистых культур метаногенных архей использовали различные антибактериальные препараты: ванкомицин (100–200 мг/л), бензилпенициллин (2 г/л), ампициллин (1 г/л) или рифампицин (100 мг/л) (Parshina et al., 2014). При выделении чистых культур синтрофных бактерий в качестве ингибитора жизнедеятельности архей использовали бромэтансульфоновую кислоту.

Посев на твердую агаризованную среду. Посев на твердую агаризованную среду проводили с применением модифицированной методики Хангейте (Hungate, 1969). Среду готовили стандартным образом, добавляя 4% агара. Под током азота или аргона агаризованную среду разливали по пробиркам Хангейте (пенициллиновым флаконам) в количестве 5 мл и стерилизовали при 1 атм 30–40 мин. После стерилизации в пробирки с расплавленным на водяной бане агаром добавляли субстраты и инокулят (0,1 мл) и аккуратно перемешивали, не допуская образования пузырей и пены. Затем пробирки вращали на ледяной крошке для получения тонкого слоя агара на стенках пробирки. Во избежание смыва выросших колоний образующимся конденсатом, культивирование проводили в перевернутом состоянии. Выросшие колонии стерильно отбирали с помощью шприца и пересевали на жидкую среду с соответствующими субстратами.

Проверка чистоты культур. О чистоте культур судили по результатам микроскопии, отсутствию роста на среде с глюкозой (для метаногенных архей), единообразию морфологии колоний, образующихся при росте на агаризованной среде, а также с помощью молекулярно-биологических методов.

3.6.5 Определение оптимальных условий роста

Определение оптимальных условий, а также диапазона роста изучаемой культуры проводили на среде Пфеннига с добавлением 20 мМ сахарозы в качестве субстрата для роста. Температура культивирования составляла 55°C, если другое не указано.

Рост культуры изучали в интервале температур от 15 до 80°C, диапазоне pH от 3,5 до 10,0, концентрации NaCl от 0 до 4%, при содержании кислорода в газовой фазе 0%, 5% и 10%.

При определении оптимумов температуры, pH и концентрации NaCl регулярно проводили измерения оптической плотности.

Максимальные скорости роста рассчитывали во время экспоненциальной фазы и определяли по формуле $V_{max} = (D_k - D_n) / (T_k - T_n)$, где

V_{max} – максимальная скорость роста,

D_k – максимальная оптическая плотность в конце экспоненциальной фазы,

D_n – минимальная оптическая плотность в начале экспоненциальной фазы,

T_k – время окончания экспоненциальной фазы,

T_n – время начала экспоненциальной фазы.

3.6.6 Определение способности культуры к спорообразованию

Способность изучаемой бактерии к спорообразованию определяли путем нагревания флакона со старой культурой (более 10 сут) на водяной бане в течение 30 мин при 90°C. После охлаждения прогретую культуру пересеивали на стандартную среду с добавлением 20 мМ сахарозы и культивировали при температуре 55°C.

3.6.7 Проверка способности штамма SP2 к синтрофному росту

Проверку способности выделенной бактерии к синтрофному росту проводили при совместном культивировании с водород-использующим метаногеном *Methanothermobacter thermautotrophicus* (100% сходства), выделенным в ходе работы из того же консорциума. В качестве субстратов использовали: ацетат натрия (с и без добавления NH_4Cl), пропионат натрия, бутират натрия, этанол, метанол, глицерин, бетаин, лактат.

3.6.8 Микроскопия

Световая микроскопия. Изучение морфологии и численности клеток метаногенных архей и синтрофных бактерий при росте на различных субстратах, а также оценку чистоты выделенных культур проводили с помощью микроскопов AxioLab.A1 и AxioImager.D1 (Carl Zeiss, Германия) с фазово-контрастным устройством. Микроскопию проводили с масляной иммерсией. Для съемки фотографий использовали камеру AxioCam (Carl Zeiss, Германия).

Морфологию флоккул, образующихся в результате обработки полиакриламидным флокулянтном, изучали с использованием светового микроскопа Bresser Researcher (Германия).

Электронная микроскопия. Для изучения микроструктуры клеток, включений и жгутиков использовали трансмиссионный электронный микроскоп JEOL 100С XII (Япония).

3.7 Аналитические методы

Определение сухого веса образцов и содержания органических веществ. Сухой вес (СВ) – массу органических и неорганических веществ – определяли после высушивания

образцов до постоянной массы при 105°C. Зольный остаток (неорганическое вещество) определяли при сжигании сухого образца в муфельной печи (СНОЛ–1,6.2,5.1/11–И1М, Термикс, Россия) до постоянной массы при 650°C. Беззольное (органическое) вещество вычисляли как разницу по массе между СВ и зольным остатком. Результаты выражали в г СВ (ОВ)/г сырой биомассы или г СВ (ОВ)/л. Все измерения проводили в трех повторностях.

Определение pH. Кислотную реакцию (pH) исследуемых смесей определяли с помощью портативного pH-метра 320 (WTW, Германия), а также с помощью универсальной индикаторной бумаги (Erba Lachema, Чехия).

Определение состава газовой фазы. Содержание газообразных продуктов (H₂, CH₄, CO₂) определяли методом газовой хроматографии на хроматографе Хроматэк – Кристалл 5000.1 (Россия) с пламенно-ионизационным детектором. В качестве сорбентов использовали NaX и NaуеSep N 80/100. Длина колонки составляла 3 м, внутренний диаметр – 2 мм, температура колонки – 40°C, температура детектора и испарителя – 200°C, расход водорода – 25 мл/мин, расход воздуха – расход 250 мл/мин, газа-носителя аргона – 25 мл/мин, объем исследуемой пробы – 500 мкл.

Скорости метаногенеза рассчитывали, исходя из увеличения концентрации метана в газовой фазе флаконов с учетом избыточного давления и температуры инкубации. Среднюю скорость рассчитывали, как количество образовавшегося метана за весь период проведения экспериментов и выражали в ммоль CH₄/(г СВ сут) или в ммоль CH₄/(г ОВ сут).

Определение состава ЛЖК в жидкой фазе. Концентрацию ЛЖК в среде определяли методом газовой хроматографии на хроматографе Хроматэк – Кристалл 5000.2 (Россия) с пламенно-ионизационным детектором. Длина колонки составляла 1 м, внутренний диаметр 2 мм, в качестве сорбента использовали Sovpol–5. Температура испарителя – 180°C, температура детектора – 180°C, температура колонки – 180°C, расход газа-носителя аргона составлял 40 мл/мин, расходы водорода и воздуха составляли 20 и 400 мл/мин, соответственно.

Модификация метода подготовки проб для определения ЛЖК. С целью предотвращения загрязнения колонки хроматографа продуктами деградации отходов, которые, кроме того, препятствуют качественному разделению ЛЖК и спиртов, была разработана оптимизированная схема подготовки образцов для хроматографического анализа. Для удаления высокомолекулярных соединений использовали смесь сорбентов: аэросила (аморфный диоксид кремния SiO₂ с удельной поверхностью 300 м²/г) и силикагеля (высокодисперсный порошок mSiO₂*nH₂O). Пробы для определения концентрации ЛЖК центрифугировали при 10 тыс. об/мин в течение 5–10 мин, переносили надосадочную жидкость в чистую пробирку и подкисляли 10%-ным раствором концентрированной H₃PO₄ до pH 1–2. Затем добавляли сорбенты из расчета 0,01 г аэросила и 0,01 г силикагеля на 200 мкл пробы и перемешивали на

вortexe. Полученную суспензию центрифугировали при 10–12 тыс. об /мин в течение 5 мин, после чего переносили надосадочную жидкость в чистую пробирку. Было показано, что аэросил и силикагель не сорбируют ЛЖК и спирты (C₁–C₅), поэтому не оказывают негативного влияния на точность анализа.

Концентрацию отдельных ЛЖК выражали в мМ или г/л. Суммарную концентрацию ЛЖК (ЛЖК_{сум}, г/л) рассчитывали путем суммирования концентраций каждой отдельной жирной кислоты, пересчитанных в эквивалентах уксусной кислоты с учетом коэффициента пересчета. Коэффициенты пересчета для уксусной, пропионовой, н-/изомасляной, н-/изовалериановой кислоты составляли 1,00, 0,81, 0,68 и 0,59, соответственно (Ibrahim et al., 2014).

Содержание общего аммонийного азота в жидкой фракции (ОАА) определяли с помощью спектрофотометра DR5000 (Hach Lange GmbH, Germany). Пробу центрифугировали при 13 тыс. об/мин в течение 5 мин, затем переносили надосадочную жидкость в чистую пробирку. Минеральный стабилизатор, поливиниловый спирт и реактив Несслера (HachLange GmbH, Germany) добавляли к разведенному образцу и измеряли поглощение при длине волны в 425 нм. Концентрацию ОАА выражали в мг/л.

Содержание свободного аммонийного азота (аммиака) (САА) рассчитывали согласно уравнению (Hansen et al., 1998):

$$\text{ОАА} = \text{САА} \times \left(1 + \frac{10^{-\text{pH}}}{10^{-(0.09018 + \frac{2729.92}{T(K)})}} \right)^{-1}$$

Где САА – это концентрация свободного аммонийного азота в г/л, ОАА – измеренная концентрация общего аммонийного азота в г/л, T (K) – температура в Кельвинах.

Химическое потребление кислорода (ХПК) и *щелочность* в жидкой фракции определяли с помощью спектрофотометра DR5000 (Hach Lange GmbH, Germany) с использованием стандартных методик и коммерчески доступных наборов тестов (LCK512 и LCK362). Пробы предварительно центрифугировали при 13 тыс. об/мин в течение 5 мин. Для анализа использовали надосадочную жидкость.

3.8 Молекулярно-генетические методы

3.8.1 Анализ последовательностей гена 16S рРНК

В качестве образцов для анализа последовательностей гена 16S рРНК использовали накопительные и чистые культуры метаногенных архей и синтрофных бактерий, а также синтрофные ассоциации, адаптированные к высокой нагрузке по ЛЖК.

Выделение и очистка ДНК.

Для выделения ДНК из образцов накопительных и чистых культур использовали комбинацию модифицированного метода щелочного выделения ДНК Бирнбойма-Доли и Wizard–технологии компании Promega (США) (Boulygina et al., 2002). Суспензию бактериальных клеток осаждали путем центрифугирования, удаляли супернатант, осадок обрабатывали лизирующим буферным раствором (225 мкл), содержащим 50 мМ трис-НСl (рН 8,0), 5 мМ ЭДТА, 50 мкг/мл панкреатической РНКазы, 0,2 М NaOH, 1% раствор SDS, и тщательно перемешивали. Полученную суспензию инкубировали при 65°C в течении 45 мин, охлаждали до комнатной температуры, после чего добавляли нейтрализующий буфер (125 мкл), содержащий 2,5 М раствор ацетата калия (рН 4,5), и тщательно перемешивали на вортексе, затем центрифугировали при 14000 об/мин в течение 10 мин и переносили супернатант в чистую пробирку.

Выделенную ДНК очищали с помощью сорбирующей смолы Wizard MaxiPreps DNA Purification Rezin (Promega, США). В пробирки с супернатантом вносили по 200 мкл сорбирующей смолы, тщательно пипетировали и переносили в микроколонки, входящие в набор. Для удаления остатков белков и других биополимеров отмывали микроколонки с помощью промывочного буфера (2 мл), содержащего 100 мМ NaCl, 10 мМ трис-НСl, 2,5 мМ ЭДТА и 70% этанол. Затем микроколонки центрифугировали при 14000 об/мин в течение 3 мин, переносили в чистые пробирки, добавляли по 50 мкл деионизированной воды и инкубировали при 65°C в течение 3 мин для перевода ДНК с колонки в раствор. После центрифугирования микроколонки удаляли, повторяли центрифугирование и переносили супернатант в чистые пробирки. Очищенную ДНК хранили в холодильнике при температуре –20°C.

Перед проведением ПЦР оценивали качество выделения ДНК с помощью электрофореза в 1,5%-ном агарозном геле в 1X буфере TAE.

Аmplификация гена 16S рРНК.

Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) позволяет провести амплификацию различных генов и их фрагментов. В нашей работе полученные продукты амплификации исследовались с помощью методов клонирования и секвенирования.

Перед молекулярным клонированием проводили амплификацию полноразмерной копии гена 16S рРНК микроорганизмов, входящих в состав синтрофных консорциумов, адаптированных к высокой нагрузке по ЛЖК, с использованием универсальных бактериальных (11F/1492R) и архейных (A8F/1492R) праймеров. Характеристики праймеров представлены в табл. 16.

Таблица 16. Характеристики праймеров, использованных для амплификации полноразмерной копии гена 16S рРНК.

Название праймера	Нуклеотидная последовательность, 5'–3'	Специфичность праймера	Ссылка
11F	GTTTGATCMTGGCTCAG	Домен Bacteria	Lane, 1991
A8F	TCCGGTTGATCCTGCCGG	Домен Archaea	Lane, 1991
1492R	TACGGYTACSTTGTACGACTT	Bacteria, Archaea, Eukarya	Tajima et al., 2001

В состав смеси для амплификации входили 1X буфер ДНК полимеразы BioTaq, по 12,5 нмоль каждого из dNTP, по 5 пмоль соответствующих праймеров, 3 ед. ДНК полимеразы BioTaq (Диалат ЛТД, Россия) и 50 нг выделенной ДНК. Общий объем смеси составлял 50 мкл. Режим амплификации включал первый цикл: 94°C – 9 мин, 55°C – 1 мин, 72°C – 2 мин; затем 30 циклов: 94°C – 1 мин, 55°C – 1 мин, 72°C – 2 мин; завершающий цикл: 72°C – 2 мин; охлаждение до 4°C.

Детекция и очистка продуктов ПЦР. Наличие ампликонов детектировали при помощи электрофореза в 1%-ном агарозном геле, приготовленном на 1X TAE буфере, при напряжении 120 В. Для визуализации ДНК перед заливкой геля добавляли 10 мкл раствора бромистого этидия. Для анализа использовали 7–8 мкл образца, смешанного с 1 мкл специальной краски (1X Gel Loading dye, Blue, BioLabs, Великобритания). В качестве маркера длин фрагментов ДНК использовали 100+ bp DNA Ladder (Евроген, Россия). Результаты электрофореза детектировали с помощью гель-документирующей системы GelDoc XR (BioRad, США). Очистку ПЦР–продуктов проводили с помощью наборов реактивов Wizard PCR Preps (Promega, США), в соответствии с рекомендациями производителя.

3.8.2 Молекулярное клонирование

Для исследования фрагментов ДНК, полученных в ходе ПЦР, использовали метод молекулярного клонирования. Очищенные ПЦР–продукты встраивали в плазмиду pGEM–T EasySystem (Promega) (50 н.г.) и проводили трансформацию компетентных клеток *Escherichia coli* методом электропорации. Методика включала несколько этапов.

Этап 1 – лигирование. К смеси двухкратного буфера Rapid Ligata Buffer Tu DNA Ligase (7,5 мкл), лигазы Tu DNA Ligatia (1 мкл, 3 ед./мкл) и вектора pGEM–T Vector (1 мкл, 50 н.г.) вносили очищенные ПЦР–продукты (5,5 мкл). После тщательного перемешивания пробирки помещали в холодильник при 4°C на 24 ч, после чего прогревали при 22°C в течение 1 ч. Лигазу инактивировали путем прогрева при 65°C в течение 10 мин. Для отмывки вносили 15 мкл хлороформа, центрифугировали при 14000 об/мин в течение 40 сек, верхнюю фракцию переносили в чистые пробирки.

Этап 2 – получение электрокомпетентных клеток. Ночную культуру *E. coli* засеивали на среду LB (1 мл на 100 мл среды), инкубировали на качалке в течение 3,5 ч при температуре 37°C. Охлажденную культуру (0°C, 5 мин) центрифугировали при 4500 об/мин в течение 7 мин. Полученный осадок сначала трижды промывали деионизированной водой (20 мл) и центрифугировали при 4500 об/мин в течение 7 мин, а затем 4%-ным раствором глицерина (4 мл) и центрифугировали. Клетки, ресуспендированные в равном объеме 10%-ного раствора глицерина, использовали для электропорации.

Этап 3 – получение клонов *E. coli*. Электропорацию проводили с помощью ячеек “Eppendorf”, предварительно охлажденных во льду. К ДНК, полученной на этапе 1, добавляли суспензию электрокомпетентных клеток (40 мкл), аккуратно перемешали и переносили в ячейки электропоратора по 2 мкл смеси и 2 мкл деионизированной воды. Электропорацию проводили под воздействием импульса при 1407 V, 3,6 мс. Затем клетки вымывали из ячеек с помощью среды SOC (1 мл), переносили в пробирки, в которых культивировали при 37°C в течение часа. После чего проводили посев на чашки со средой LB, содержащей ампициллин. Через сутки стерильно переносили колонии белого цвета (клоны *E. coli* со встроенным вектором) в плашки со средой LB, которые инкубировали на шейкере при 37°C в течение суток. Затем плашки центрифугировали, удаляли надосадочную жидкость и приступали к выделению плазмидной ДНК клонов *E. coli*.

Для выделения ДНК использовали метод, описанный ранее, с небольшими модификациями. Объем лизирующего буфера составлял 60 мкл, продолжительность инкубации – 10 мин при комнатной температуре, затем добавляли нейтрализующий буфер (30 мкл) и перемешивали на шейкере BioSan при 600 об/мин в течение 30 сек. После центрифугирования при 3700 об/мин, 15 мин, аккуратно переносили надосадочную жидкость в лунки новой плашки, куда был ранее внесен изопропанол (50 мкл). Центрифугировали при 4000 об/мин в течение 15 мин. Осадок инкубировали с 70%-ным раствором этанола (70 мкл) в течение 10 мин при комнатной температуре, затем центрифугировали при 4000 об/мин, 15 мин. После удаления надосадочной жидкости осадок высушивали при комнатной температуре, затем вносили по 15 мкл деионизированной воды, тщательно перемешивали, инкубировали при 37°C, 15 мин, затем центрифугировали. Надосадочную жидкость использовали для секвенирования.

3.8.3 Секвенирование и филогенетический анализ полученных последовательностей

Для секвенирования продуктов амплификации использовался метод Сэнгера (Sanger et al., 1977). Секвенирование проводили с помощью набора реактивов Big Dye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Inc., USA) на генетическом анализаторе ABI PRIZM 3730 (Applied Biosystems, Inc., USA), согласно приложенным инструкциям.

Редактирование полученных спектрограмм проводили с помощью программы Chromas, версия 2.6.5 (<https://technelysium.com.au/wp/chromas/>). Первичный анализ полученных последовательностей генов 16S рРНК с последовательностями, представленными в базе данных GenBank, проводили с помощью сервиса NCBI Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Проверку последовательностей на химерность осуществляли с помощью сервиса Find Chimeras (<http://decipher.cee.wisc.edu/FindChimeras.html>).

Анализ и редактирование последовательностей, а также создание библиотек для сравнения с известными последовательностями генов 16S рРНК других видов микроорганизмов проводили с помощью редактора BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). Выравнивание последовательностей проводили с помощью алгоритма CLUSTAL W v 1.75.

Для построения филогенетических деревьев использовали программу Mega 6.0 (<https://www.megasoftware.net/>). При построении филогенетических деревьев использовали алгоритм Neighbor-joining, с применением метода анализа 1000 альтернативных деревьев.

3.8.4 Исследование генома штамма SP2

Эксперименты проводили в Институте Биоинженерии под руководством к.б.н. Д.С. Груздева. Выделение ДНК проводили по методу Вилсона (Wilson, 2001). Геномные библиотеки создавали с использованием набора NEBNext DNA library prep для платформы Illumina, согласно инструкциям производителя. Секвенирование проводили с использованием секвенатора Illumina HiSeq 1500, длина чтений составляла 220 п.н. Качество полученных последовательностей оценивали с помощью сервиса FastQC v.11.7 (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Последовательности низкого качества были удалены с помощью программы Trimmomatic v. 0.36 (Bolger et al., 2014). Прошедшие оценку качества последовательности были собраны de novo с помощью пакета программ SPAdes версии 3.11.0 с использованием базовых настроек (Bankevich et al., 2012). Всего было получено 2,566,901 чтений, которые были собраны в 101 контиг (длинные фрагменты перекрывающихся ДНК последовательностей). Общий размер генома составил 3,526,989 п.н. со средним покрытием 160x. Наиболее длинный фрагмент составлял 187,339 п.н., значение N50 составило 91,597 п.н., содержанием Г+Ц в 43,1%. Аннотацию генома проводили с помощью NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP) (Tatusova et al., 2013). Было идентифицировано 3573 гена, 3426 кодирующих последовательностей, 88 псевдогенов и 49 генов тРНК. Геном депонирован в GenBank под номером QSNL000000000. Филогенетический анализ на основе последовательностей гена 16S рРНК проводили с использованием метода максимального правдоподобия (maximum-likelihood) с IQ-TREE (Nguyen et al., 2015; Kalyaanamoorthy et al., 2017) путем анализа 1000 альтернативных деревьев (Felsenstein, 1985).

ЧАСТЬ 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Глава 4. Процесс термофильного сбраживания коммунальных органических отходов со сниженной влажностью и повышенной нагрузкой в периодическом и непрерывном режимах

4.1 Ко-ферментация пищевых отходов и осадков сточных вод

Подбор активного инокулята – один из важнейших этапов подготовки к запуску анаэробного биореактора. Правильно подобранный инокулят позволяет увеличить нагрузку на реактор, снизить влажность обрабатываемого субстрата, снизить время удержания и уменьшить исходное соотношение инокулята к субстрату без угрозы дестабилизации процесса (De la Rubia, 2013; Shah et al., 2014). Подбор оптимального инокулята для инициации процесса анаэробной ко-ферментации пищевых отходов и избыточного активного ила с пониженной влажностью исследовали в стеклянных флаконах объемом 500 мл при 50°C.

Процесс сбраживания пищевых отходов и избыточного активного ила состоял из двух основных стадий: кислотогенной – гидролиз биополимеров и сбраживание мономеров до ЛЖК, и метаногенной – синтрофное разложение ЛЖК и синтез метана.

Кислотогенная стадия. Высокая исходная нагрузка (71,2±1,5 г ОВ/л), низкая влажность и низкое соотношение инокулята к субстрату (15±5%/85±5%) привели к резкому возрастанию количества ЛЖК (9,8–14,0 г/л, табл.17) и снижению pH до 5,4–6,0 на первом этапе эксперимента во всех опытных смесях, независимо от использованного инокулята. Образование метана при этом не происходило.

Избыточное накопление ЛЖК в среде, приводящее к падению pH, – основная сложность при сбраживании ПО (Kim et al., 2003; Iacovidou et al., 2012; Fisgativa et al., 2016; Moñino et al., 2016). Снижение pH до 5,4–6,0 ингибировало активность метаногенных архей, для которых оптимумом является pH 6,5–7,2 (Appels et al., 2008). При разложении ОВ сбраживаемой смеси наблюдали образование большого количества ацетата (74,8–118,1 мМ) и бутирата (53,9–69,5 мМ). Известно, что концентрации ацетата выше 83 мМ (5,0 г/л) и бутирата выше 34 мМ (3,0 г/л) негативно влияют на активность метаногенов (Kim et al., 2006; Lins et al., 2010). Концентрация пропионата не превышала 4,0–14,1 мМ. Однако имеются данные, что при снижении pH пропионат может оказывать ингибирующее воздействие на ацетогенных бактерий и метаногенных архей при концентрации 12 мМ и выше (Wang et al., 2009).

Термофильные микроорганизмы более чувствительны к изменениям pH (Kim et al., 2003; Kawai et al., 2014). Поэтому закисление сбраживаемой массы привело к полной дестабилизации

сбраживания, которая не восстанавливалась со временем. Наши данные подтверждают теорию Ванга и соавт., что степень кислотного ингибирования зависит от сложности субстрата, сбраживаемого в биореакторе (Wang et al., 2009). При сбраживании смеси ПО и ОСВ полное прекращение образования метана наблюдали при концентрациях ацетата, бутирата и пропионата выше 74,8 мМ, 53,9 мМ и 4,0 мМ, соответственно. При этом при сбраживании глюкозы при внесении 220 мМ ацетата, 172 мМ бутирата и 48 мМ пропионата наблюдали лишь снижение скорости продукции метана в 2 раза (Dogan et al., 2005).

Таблица 17. Накопление летучих жирных кислот в ходе кислотогенной фазы термофильного сбраживания (50°C) пищевых отходов с примесью избыточного активного ила.

Состав смеси	Время инкубации, сут	Летучие жирные кислоты, мМ*			Сумма ЛЖК, г/л
		ацетат	пропионат	бутират	
Субстрат + буфер (контроль)	0	18,4	0,5	0,1	1,2
	7	23,6	0,5	0,2	1,5
	31	74,5	31,2	34,6	9,8
Субстрат + Грунт ТБО	0	16,9	0,6	0,1	1,1
	7	18,9	0,6	0,1	1,2
	31	117,1	11,2	69,5	14,0
Субстрат + Упл. ил	0	17,3	0,6	0,5	1,1
	7	20,5	1,0	2,5	1,5
	31	118,1	14,1	61,1	13,5
Субстрат + Пресс. ил	0	17,1	0,6	0,1	1,1
	7	32,4	0,7	0,2	2,0
	31	78,5	9,4	65,8	11,2
Субстрат + Грунт ТБО + Упл. ил	0	14,3	0,1	0,1	0,9
	7	20,4	0,4	0,5	1,3
	31	86,8	6,3	53,9	10,4
Субстрат + Грунт ТБО + Пресс. ил	0	23,2	0,4	0,4	1,5
	7	23,6	0,9	4,3	1,9
	31	74,8	4,0	58,1	9,9

*Погрешность измерений составляет 0,1 – 0,3 мМ.

Внесение химикатов (CaCl₂, NaOH и др.) для повышения буферной емкости и щелочности является одним из самых распространенных способов преодоления дестабилизации, вызванной избыточным накоплением ЛЖК (Pavan et al. 2007; Chen et al., 2010). Для восстановления оптимального pH проводили подщелачивание с помощью раствора 1н NaOH. При устойчивом закислении этот метод оказался малоэффективен и давал лишь кратковременный эффект. При смещении pH в слабокислую и нейтральную области активность кислотогенных бактерий, более устойчивых к колебаниям pH и имеющих более высокие скорости роста, восстанавливалась (Wang et al., 2009). В результате их жизнедеятельности образовывались новые порции ЛЖК, и процесс вновь дестабилизировался.

Внесение белковых субстратов для снижения соотношения C/N также применяется в качестве способа преодоления закисления (Pavan et al., 2007; Iacovidou et al., 2012; Fisgativa et al., 2016). Данный способ в работе не применяли, т.к. внесение дополнительной порции субстрата повысило бы концентрацию ОВ, что, вероятнее всего, способствовало бы дальнейшей дестабилизации процесса. Увеличение доли избыточного активного ила в исходной смеси, вероятно, позволило бы избежать дестабилизации процесса, т.к. активный ил содержит около 32–41% белков в своем составе (Iacovidou et al., 2012; Ножевникова и др., 2016). ОВ активного ила разлагается медленнее, чем ОВ пищевых отходов, что также могло бы снизить скорость накопления ЛЖК (Arnaiz et al., 2006). Для сбраживания использовалась концентрированная смесь ПО и избыточного активного ила в соотношении 3:1 по СВ (4:1 по ОВ). Однако для первичного запуска анаэробного биореактора рекомендуют соотношение ПО/ОСВ – 1/1 – 1/2 по СВ (Neo et al., 2003). Тем не менее, Ким с соавт. показали, что при поддержании невысокой нагрузки по ОВ можно осуществить запуск стабильного анаэробного процесса с различным соотношением ПО/ОСВ в сбраживаемой смеси, при этом с увеличением доли ПО с 20 до 80% (как в нашем случае) выход метана будет увеличиваться (Kim et al., 2003). Известно, что избыточный активный ил содержит анаэробные микроорганизмы, в том числе метаногенные археи (Литти и др., 2013). Поэтому увеличение его доли в субстратной смеси могло способствовать возрастанию плотности анаэробных микроорганизмов.

Остановка загрузки свежего субстрата в реактор (при непрерывном режиме работы реактора), а также частичный отъем сбраживаемой смеси и внесение дополнительных порций свежего инокулята рекомендуется как способ преодоления кислотогенной дестабилизации работы анаэробного реактора (Pavan et al., 2007; Chen et al., 2010; Iacovidou et al., 2012; Fisgativa et al., 2016).

Одновременный частичный отъем сбраживаемой массы (снижение нагрузки по СВ на $15,8 \pm 0,8\%$ от исходного), увеличение доли инокулята (до 30–40% в расчете на суммарное ОВ) и химическое подщелачивание с помощью раствора 1н NaOH способствовали восстановлению процесса метаногенеза в исследуемых образцах. Все эти процедуры привели к повышению влажности сбраживаемой смеси на 1,5–2,0%, что также способствовало стабилизации процесса. Т.к. в ходе кислотогенной стадии образовалось большое количество ацетата, инокулят был предварительно активирован добавлением ацетата (3 г/л) в течение 7 сут. Этот способ позволяет повысить активность микроорганизмов, использующих ацетат, в первую очередь ацетокластических метаногенных архей.

Выбранное для запуска процесса ко-ферментации ПО и ОСВ соотношение инокулята к субстрату оказалось слишком малым. Это привело к дестабилизации процесса из-за недостаточной плотности микроорганизмов, осуществляющих заключительные стадии

конверсии ОВ в метан (синтрофных бактерий и метаногенных архей). Это подтверждается также тем, что при внесении дополнительной порции инокулята, процесс стабилизировался. В других работах показано, что для запуска процесса сбраживания богатых доступной органикой отходов, таких как ОФ-ТБО и ПО, оптимальным соотношением инокулята к субстрату является 1:1 – 3:1 по массе (Khalid et al., 2011; Kawai et al., 2014; Shah et al., 2014).

В ходе кислотогенной стадии 39,8–48,9% ОВ сбраживаемой смеси разложилось до летучих компонентов (ЛЖК, спирты, CO₂, H₂).

Метаногенная стадия. После стабилизации процесса ферментации пищевых отходов дальнейшую инкубацию проводили в течение 8 сут при 50°C. При этом накопленные в ходе кислотогенной стадии ЛЖК были преобразованы в метан (табл. 18).

Таблица 18. Концентрация летучих жирных кислот после увеличения дозы инокулята через 8 сут термофильного сбраживания смеси пищевых отходов и избыточного активного ила.

Состав смеси	Летучие жирные кислоты, мМ*			Сумма ЛЖК, г/л
	ацетат	пропионат	бутират	
Субстрат + буфер (контроль)	93,6	45,4	45,8	13,0
Субстрат + Грунт ТБО	6,0	18,2	0,1	1,7
Субстрат + Упл. ил	67,2	7,6	44,8	8,5
Субстрат + Пресс. ил	7,1	12,7	41,9	5,1
Субстрат + Грунт ТБО + Упл. ил	4,1	25,2	0,1	2,1
Субстрат + Грунт ТБО + Пресс. ил	7,2	13,8	0,1	1,5

*Погрешность измерений составляет 0,1–0,3 мМ.

Из табл. 18 видно, что в образцах, в которых в качестве инокулята использовалась суспензия грунта полигона ТБО, с высокой эффективностью удаляются бутират и ацетат. Это позволяет заключить, что грунт полигона ТБО обогащен бутират-использующими синтрофными бактериями и потребляющими ацетат микроорганизмами. Ранее Стампс с соавт. показали, что в теле полигонов ТБО и в их фильтрах преобладают группы бактерий, в которых встречаются синтрофы (*Syntrophobacterales*, *Desulfuromonadales*, *Desulfovibrionales*, *Clostridia*, *Thermatogae* и др.) (Stamps et al., 2016).

Таблица 19. Скорости метаногенеза при термофильном сбраживании смеси пищевых отходов и избыточного активного ила.

Состав смеси	Средняя скорость метаногенеза, ммоль CH ₄ /г органического вещества сут
Субстрат + Грунт ТБО	3,57±0,18
Субстрат + Упл. ил	0,53±0,03
Субстрат + Пресс. ил	1,72±0,09
Субстрат + Грунт ТБО + Упл. ил	4,08±0,20
Субстрат + Грунт ТБО + Пресс. ил	4,77±0,24

На рис. 4 представлена динамика накопления метана в ходе метаногенной стадии термофильного сбраживания смеси ПО и активного ила.

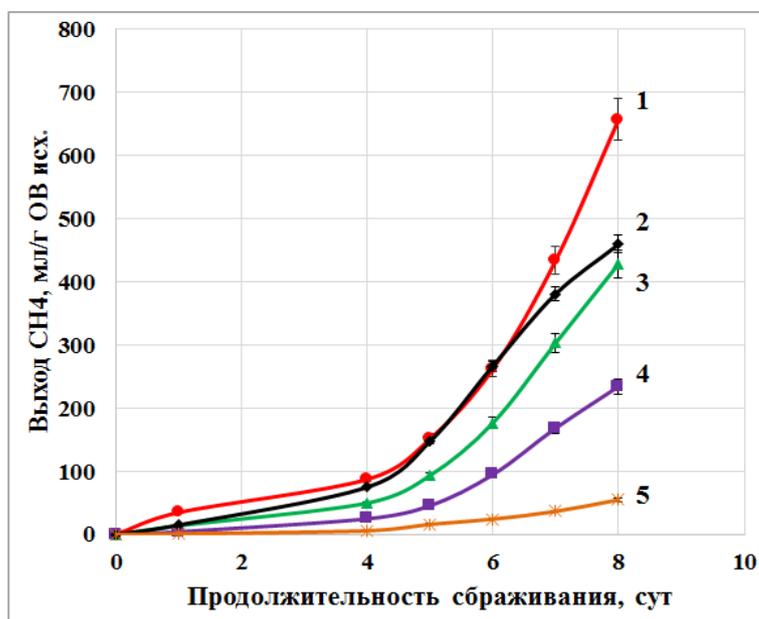


Рис. 4. Динамика накопления метана (мл/г ОВ исх) в ходе термофильного сбраживания (50°C) смеси пищевых отходов и избыточного активного ила с использованием в качестве инокулята (1) Грунт ТБО + Пресс. ил, (2) Грунт ТБО + Упл. ил, (3) Грунт ТБО, (4) Пресс. ил, (5) Упл. ил.

При использовании смешанных инокулятов, а именно смеси прессованного сброженного ОСВ с активированной суспензией грунта полигона ТБО и смеси уплотненного сброженного ОСВ с активированной суспензией грунта полигона ТБО наблюдали максимальные скорости образования метана – 4,77 ммоль $\text{CH}_4/\text{г ОВ сут}$ и 4,08 ммоль $\text{CH}_4/\text{г ОВ сут}$, соответственно (табл. 19). Смешанный инокулят, вероятнее всего, обладал более разнообразным микробным сообществом и большей плотностью метаногенных архей и синтрофных бактерий. Т.к. пищевые отходы составляют существенную часть ОФ-ТБО, подвергающейся захоронению на полигонах ТБО (Ножевникова и др., 2016; Clarke, 2017), то грунт полигона ТБО, вероятнее всего, обогащен микроорганизмами, приспособленными для разложения этих отходов. Кроме того, количество ОВ смешанного инокулята в экспериментальных образцах было на 6–10% выше по сравнению с образцами, инокулированными отдельными инокулятами.

Относительно высокая скорость метаногенеза (3,57 ммоль $\text{CH}_4/\text{г ОВ сут}$) показана для смеси, инокулированной только суспензией грунта полигона ТБО. При добавлении в качестве инокулятов уплотненного или прессованного сброженных ОСВ скорости метаногенеза были существенно ниже – 0,53 и 1,72 ммоль $\text{CH}_4/\text{г ОВ сут}$, соответственно (табл. 19).

Суспензия грунта полигона ТБО обеспечивает более высокую скорость образования метана, поэтому является более предпочтительным инокулятом по сравнению со сброженными ОСВ. Грунт полигона ТБО содержит разнообразные группы микроорганизмов, приспособленные к разложению ОФ-ТБО, в том числе и в термофильных условиях. В ходе разложения ОВ отходов в свалочном теле полигонов происходит саморазогрев до 50–70°C (Ножевникова и др., 2016), что создает условия для накопления термофильных микроорганизмов. Преимуществом является повсеместная доступность грунта полигонов ТБО на всей территории России, в отличие от сброженного осадка метантенков, численность которых на территории РФ мала. Предварительная подготовка грунта полигона ТБО обязательна перед использованием его в качестве инокулята для запуска анаэробного биореактора. Необходимо удалить твердые частицы песка, глины, стекла, металлов, чтобы предотвратить их накопление в биореакторе, которое будет приводить к забивке коммуникаций и снижению производительности реактора. Затем необходимо провести активацию инокулята путем разбавления водой и инкубирования с органическим субстратом при рабочей температуре.

Сброженный ОСВ является универсальным инокулятом для запуска процессов анаэробной переработки различных ОО, т.к. содержит все необходимые группы микроорганизмов метаногенного сообщества (Appels et al., 2008; Khalid et al., 2011; Shah et al., 2014). Однако доступность сброженного осадка на территории России ограничена, т.к. технология анаэробной переработки ОСВ применяется только на очистных сооружениях крупных городов, таких как Москва и Санкт-Петербург (Ножевникова и др., 2016; Namsaraev et al., 2018). Полученные результаты свидетельствуют о том, что прессованный сброженный ОСВ (кек) обладает рядом преимуществ для использования его в качестве инокулята: низкая влажность (менее 90%) обеспечивает низкую активность микроорганизмов метаногенного сообщества и малый объем, что облегчает и удешевляет его транспортировку. При этом активность микроорганизмов быстро восстанавливается после увеличения влажности.

Высокая влажность уплотненного сброженного осадка (около 97%) и, соответственно, большой объем затрудняют его транспортировку. Кроме того, микроорганизмы сохраняют высокую активность при температуре выше 20°C, поэтому транспортировка должна осуществляться в специальных рефрижераторах или в зимнее время. Во избежание взрывов хранение инокулята должно осуществляться в емкостях с отводом газа.

Изменение температурного режима ферментации. В практике нередки случаи дестабилизации процесса термофильного сбраживания отходов, вызванные сбоями в системе подогрева анаэробных реакторов. Важным также является вопрос о возможности транспортировки сброженной биомассы для использования в качестве инокулята. Для изучения

влияния пониженных температур (20°C) на активность термофильного метаногенного сообщества, мы поместили сброженные в термофильном режиме смеси сначала в мезофильные условия, а затем инкубировали при комнатной температуре (20±2°C). В результате резкого снижения температуры с 50 до 20°C скорость метаногенеза в среднем снизилась в 5–8 раз. Поскольку сбраживание ПО изначально проводили при 50°C с использованием инокулятов, активированных также при 50°C, то в метаногенном сообществе за время проведения эксперимента селективное преимущество получили термофильные микроорганизмы. Поэтому падение скорости метаногенеза при снижении температуры инкубации вполне закономерно. Однако в сообществе присутствовали также мезофильные и психротолерантные микроорганизмы, о чем свидетельствовала заметная скорость метаногенеза при 20°C (0,3–0,6 ммоль СН₄/г ОВ в сут).

За весь период проведения ферментации смеси ПО и ОСВ в чередующихся температурных режимах разложение ОВ в исследуемых смесях составило 75–85%, что было близко к максимально возможным величинам (85–90%), наблюдаемым на практике при совместном сбраживании избыточного активного ила и ОФ-ТБО (Ножевникова и др., 2016). Содержание метана в биогазе достигало 60–65%.

Основные результаты и выводы по главе 4.1:

Показали, что основной проблемой при запуске процесса термофильного метанового сбраживания смеси пищевых отходов и избыточного активного ила при высокой нагрузке по субстрату являлось закисление сбраживаемой смеси за счет избыточного образования ЛЖК, в первую очередь ацетата. Увеличение дозы активного инокулята до 30–50% в расчете на суммарное ОВ смеси позволило стабилизировать процесс ферментации. Максимальная скорость метаногенеза наблюдалась при использовании в качестве инокулята смеси грунта полигона ТБО и прессованного сброженного осадка. При понижении температуры ферментации с 50 до 20°C разложение ОВ и образование метана продолжалось после незначительной фазы задержки.

4.2 Влияние флокулянта на термофильное сбраживание высокоуплотненных ОСВ

Эксперимент 1. Определение оптимального соотношения инокулята к субстрату при сбраживании уплотненных ОСВ.

Предварительные эксперименты во флаконах или малоемких лабораторных биореакторах необходимы для получения общих данных о закономерностях анаэробного сбраживания в реальных системах непрерывного сбраживания, подбора оптимальных условий для пуска

биореактора, прогноза возможных рисков, оценки эффективности и стабильности процесса. Для определения оптимального соотношения инокулята к субстрату (И/С) для запуска процесса сбраживания уплотненных ОСВ были проведены эксперименты с 5 различными соотношениями И/С с шагом в 15% в расчете на общее ОВ сбраживаемой смеси. Результаты эксперимента представлены в таблице 20 и на рис. 5.

Таблица 20. Характеристики процесса анаэробного сбраживания уплотненных ОСВ в зависимости от исходного соотношения инокулята и субстрата в конце эксперимента (после 18 сут сбраживания).

Соотношение инокулята к субстрату (по ОВ)	Выход CH_4 , мл/г ОВ	Разложение ОВ, %	Концентрация ЛЖК, г/л экв. ацетата	Общий аммонийный азот, мг/л	Свободный аммонийный азот, мг/л	pH
10/90	5,1±0,1	23,4	8,33±0,2	715±21	0,2±0,1	5,3
25/75	14,7±0,4	26,0	13,3±0,3	1045±31	0,3±0,1	5,0
40/60	23,9±0,7	25,3	15,26±0,3	2115±63	20,2±0,6	6,5
55/45	175,6±5,2	32,8	1,77±0,05	1424±42	81,7±2,4	7,3
70/30	159,8±4,8	31,2	0,18±0,01	1520±45	164,5±4,9	7,6
Контроль (100/0)	80,6±2,4	32,6	0,15±0,01	907±27	79,7±2,3	7,5

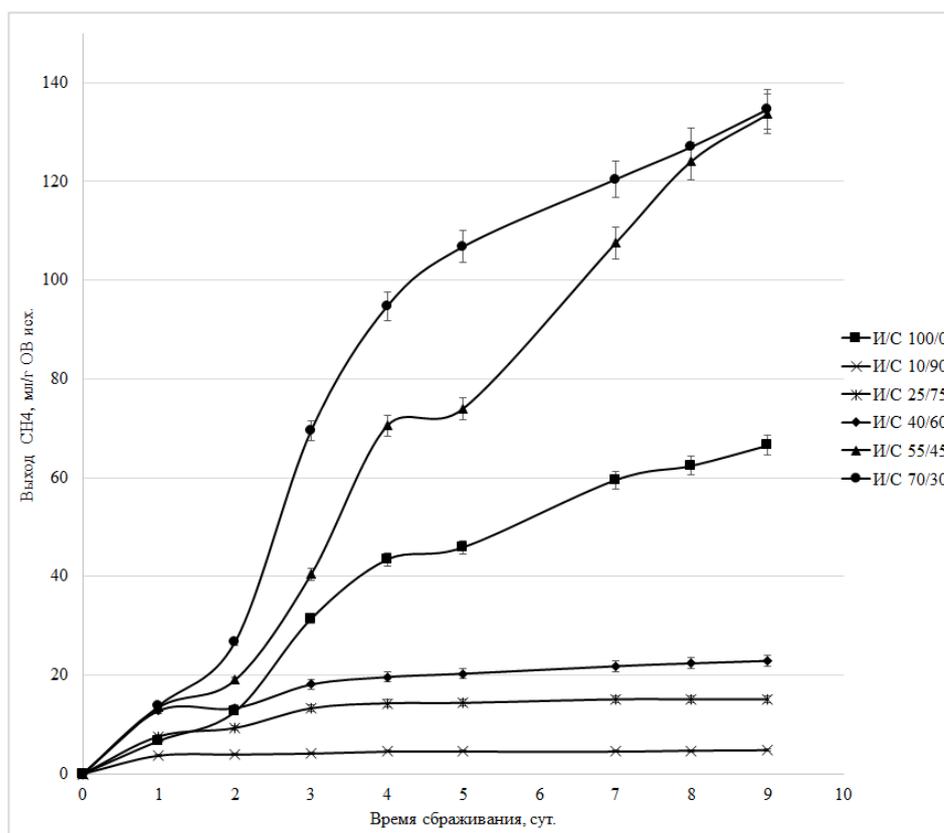


Рис. 5. Накопление метана при сбраживании уплотненных ОСВ в зависимости от исходного соотношения инокулята к субстрату (за 9 сут).

В смесях с содержанием инокулята 40% по ОВ и менее образование метана практически прекратилось после 4 сут сбраживания в связи с накоплением высоких концентраций ЛЖК – от 8,3 до 11,9 г/л. Максимальные скорости образования метана в образцах с содержанием инокулята 40% по ОВ наблюдали в первые несколько суток сбраживания, они составляли 1,95, 4,65 и 6,65 мл CH_4 /(г ОВ исх. сут) для И/С 10/90, И/С 25/75 и И/С 40/60, соответственно. Увеличение концентрации ЛЖК до 15,2–17,1 г/л и снижение pH с 7,3 до 5,0–5,3 к 11 сут сбраживания привело к ингибированию метаногенного сообщества. Ванг с соавт. показали, что полная дестабилизация анаэробного сбраживания наступает при накоплении около 10,5 г/л ЛЖК (Wang et al., 2009).

Максимальная скорость метаногенеза наблюдалась в смесях с И/С 70/30 и И/С 55/45 на 2–4 сут сбраживания и составляла 42,8 мл CH_4 /(г ОВ исх. сут) и 30,1 мл CH_4 /(г ОВ исх. сут), соответственно. При этом концентрация водорода в газовой фазе составляла не более 0,8% в течение эксперимента, а концентрация ЛЖК не превышала 1,5–3,5 г/л. Это свидетельствовало о стабильности анаэробного процесса.

В контрольных смесях, содержащих только сброженный осадок (И/С 100/0), максимальная скорость метаногенеза достигала 18,8 мл CH_4 /(г ОВ исх. сут) на 2–4 сут сбраживания. Суммарная концентрация ЛЖК не превышала 0,75 г/л, а pH находился на уровне 7,5–8,0 в течение эксперимента.

Концентрация общего аммонийного азота (ОАА) в эксперименте составляла от 715 до 2115 мг N-NH_4 /л (табл. 20). Известно, что концентрация ОАА в интервале 1670–3720 мг N-NH_4 /л снижает активность метаногенеза на 10% (Lay et al., 1997). Поэтому возможно некоторое ингибирование метаногенного сообщества в смесях с соотношением И/С 40/60. Концентрация свободного аммонийного азота (САА) не превышала 164,5 мг/л, что существенно ниже лимитирующих значений для анаэробного сбраживания высокоуплотненных ОСВ, которые для термофильного процесса составляют 620–800 мг/л (Chen et al., 2008; Duan et al., 2012; Chen et al., 2014). Однако некоторые авторы указывают на незначительное снижение метаногенной активности при концентрации САА 150–170 мг/л (Chen et al., 2008), особенно при pH выше 7,7 (Hansen et al., 1998). Уровень pH в изучаемых образцах составлял от 5,0 до 7,6, что позволяет предположить отсутствие ингибирования за счет воздействия САА.

Суммарный выход метана после 18 сут сбраживания составлял 175,6 и 159,8 мл CH_4 /(г ОВ исх) для И/С 55/45 и И/С 70/30, соответственно (табл. 20). Более высокий выход метана в смесях с соотношением И/С 55/45 связан с более высокой концентрацией доступного ОВ в субстратной смеси, поступившего из первичного осадка (на 7,5% больше). Полученные результаты коррелируют с данными Ким с соавт., которые установили, что при сбраживании смеси ОСВ в термофильных условиях в течение 16 сут выход метана составляет 163 мл/г ОВ

исх (Kim et al., 2003). В экспериментах по изучению метанового потенциала ОСВ, проведенных Астальс с соавт., выход метана составлял 324–380 мл/г ОВ исх за 35 сут (Astals et al., 2013), что существенно выше полученного в наших экспериментах и, вероятно, связано с большей продолжительностью сбраживания ОСВ.

Разложение ОВ в контрольных смесях и смесях с И/С 70/30 и И/С 55/45 составляло около 31–33%, в смесях с более низким И/С – около 23–26% (табл. 20). Полученные результаты несколько ниже данных Астальс с соавт., в экспериментах которых удаление ОВ составляло 44–60% за 35 сут (Astals et al., 2013). Причиной относительно низкой степени минерализации ОВ и выхода метана могло быть недостаточно длительное сбраживание и недостаточно эффективный массоперенос в сбраживаемой смеси, т.к. эксперименты проводились без постоянного перемешивания. Низкий выход метана может быть связан с высоким содержанием сброженного осадка и избыточного активного ила в сбраживаемой смеси, которые в основном состоят из клеточной биомассы и содержат меньшее количество доступного ОВ, чем первичный осадок. Клетки микроорганизмов достаточно устойчивы и их деструкция протекает медленно даже в термофильных условиях (Pavan et al., 2007). Малая эффективность метаногенеза в образцах с низким соотношением И/С связана с недостатком анаэробных микроорганизмов и ингибированием метаногенов за счет накопления высоких концентраций ЛЖК и снижения рН (Kim et al., 2003; Appels et al., 2008; Wang et al., 2009). При этом гидролитические и бродильные бактерии, сохраняющие свою активность до рН 4,5 (Appels et al., 2008; Ponsá et al., 2008; Wang et al., 2009), разлагали биополимеры до летучих компонентов, которые накапливались и не преобразовывались в метан.

Таким образом, для определения биохимического метанового потенциала и запуска процесса анаэробного сбраживания высокоуплотненных ОСВ во флаконах в периодическом режиме необходимо, чтобы содержание инокулята в смеси составляло не менее 55% в расчете на суммарное ОВ смеси. Полученные данные могут быть полезны при разработке методики запуска более крупных высоконагруженных лабораторных реакторов и промышленных метантенков.

Эксперимент 2. Определение токсичности ПАА-флокулянта и возможности его биodeградации в анаэробных условиях.

Для проверки биodeградебельности различных веществ используется практика тестов в небольших реакторах (флаконах) с внесением инокулята и исследуемого вещества, без добавления каких-либо альтернативных субстратов. Нами были исследованы образцы сброженного осадка с добавлением различных концентраций полиакриламидного (ПАА) флокулянта (серия Б). Выбранные концентрации ПАА охватывают интервал от рабочих

концентраций, используемых при очистке сточных вод (5 мг/г СВ), до высоких (200–400 мг/г СВ), которые потенциально могут оказывать существенное ингибирующее влияние на процесс метаногенеза. Результаты эксперимента представлены на рис. 6 и в табл. 21.

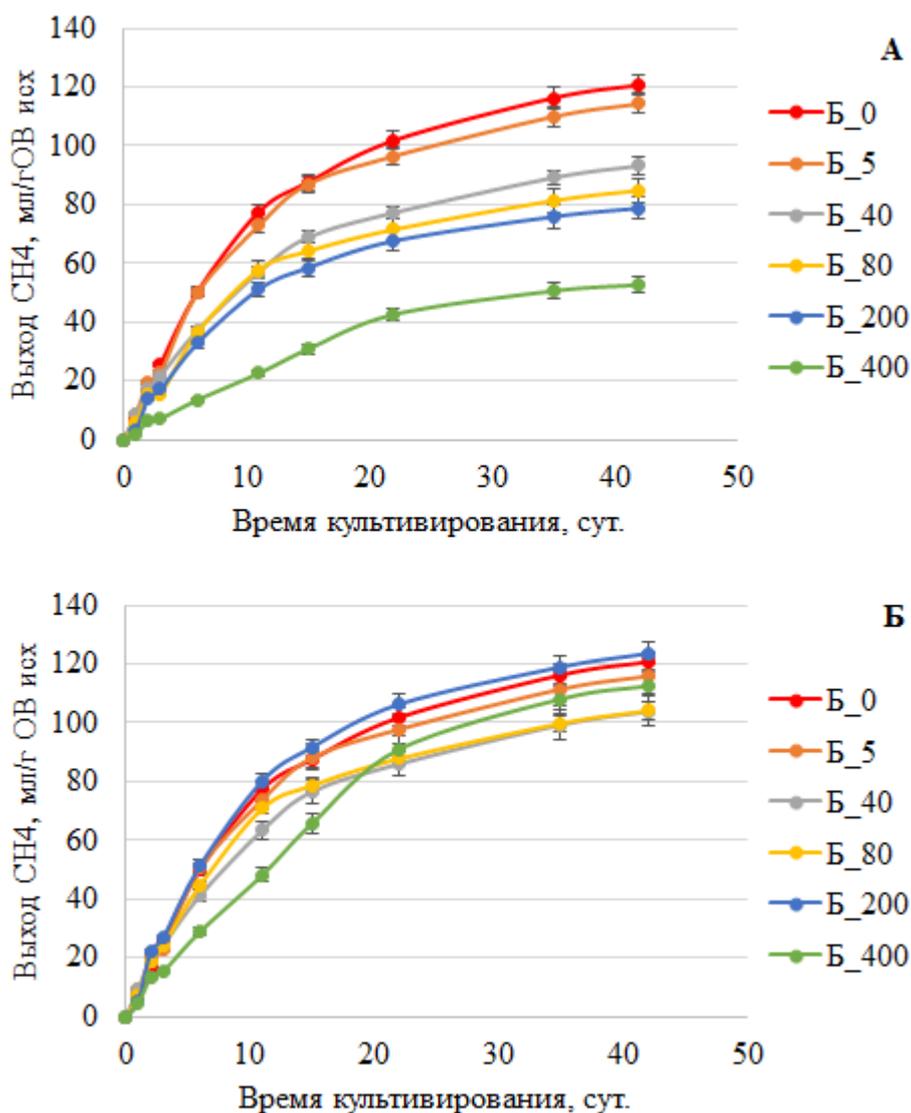


Рис. 6. Накопление метана в тесте на биodeградability полиакриламидного флокулянта (ПАА): А – с учетом ОВ внесенного ПАА, Б – без учета ОВ внесенного ПАА (учтено только ОВ сброженного ОСВ).

При расчете выхода метана с учетом ОВ флокулянта (рис. 6, А) наблюдалась четкая зависимость, что с возрастанием доли ОВ флокулянта в ОВ смеси, выход метана на г ОВ снижается. Данная зависимость не сохранялась при расчете выхода метана без учета ОВ флокулянта (рис. 6, Б). В образцах Б_200 конечный выход был на 3,1% больше, чем в контроле, а в образцах Б_5 и Б_400 выход метана был на 2,9 и 4,3% ниже, чем в контроле. Наименьший выход метана наблюдался в образцах Б_40 и Б_80 (на 14% ниже, чем в контроле). Количество

H_2 в газовой фазе не превышало 0,04%, что свидетельствовало об отсутствии ингибирования активности водород-использующих метаногенов.

Таблица 21. Изменение концентраций летучих жирных кислот и аммония в ходе культивирования смесей сброженного осадка с разными концентрациями полиакриламидного флокулянта в качестве субстрата.

Образец	Время культивирования, сут	Концентрация ЛЖК				Концентрация аммония, мг/л
		Ацетат, мМ	Пропионат, мМ	Бутират, мМ	Суммарная, г/л	
Б_0	0	0,121	0,009	0,008	0,01	35,2
	6	0,175	0,011	0,032	0,01	72,1
	22	0,203	0,240	0,012	0,03	–
	42	0,176	0,042	0,015	0,01	95,8
Б_5	0	0,121	0,009	0,008	0,01	35,2
	6	0,169	0,021	0,032	0,01	92,3
	22	0,351	0,062	0,054	0,03	–
	42	0,224	0,009	0,013	0,01	104,5
Б_40	0	0,121	0,009	0,008	0,01	35,2
	6	0,142	0,047	0,014	0,01	55,1
	22	0,229	0,015	0,042	0,02	–
	42	0,154	0,011	0,008	0,01	106,1
Б_80	0	0,121	0,009	0,008	0,01	35,2
	6	0,179	0,116	0,019	0,02	83,2
	22	0,256	0,018	0,037	0,02	–
	42	0,171	0,020	0,007	0,01	109,4
Б_200	0	0,121	0,009	0,008	0,01	35,2
	6	0,563	0,327	0,078	0,06	112,1
	22	0,158	0,020	0,047	0,01	–
	42	0,128	0,011	0,013	0,01	127,1
Б_400	0	0,121	0,009	0,008	0,01	35,2
	6	1,221	0,313	0,071	0,09	125,3
	22	0,689	0,362	0,029	0,07	–
	42	0,141	0,078	0,009	0,01	137,4

Согласно данным Дай с соавт., количество образующегося при разложении ПАА аммония зависит от исходной концентрации ПАА. При концентрации ПАА 200 мг/л из 1 г ПАА образуется около 450 мг аммонийного азота, с увеличением концентрации ПАА до 1000 мг/л, количество образующегося аммония снижается до 150 мг/г ПАА (Dai et al., 2014). Исходная концентрация ПАА составляла: 37, 296, 592, 1482 и 2964 мг/л в Б_5, Б_40, Б_80, Б_200 и Б_400, соответственно. Полученные результаты согласуются с данными Дай с соавт., т.к. в нашем случае прирост концентрации аммония в среде существенно меньше при более высоких концентрациях ПАА при расчете на абсолютные значения, чем при низких (Б_5). При

возрастании концентрации ПАА в среде, замедляется гидролиз как самой молекулы полиакриламида, так и биополимеров (Dai et al., 2014).

Наблюдалась корреляция между размером флоккул, образующихся при добавлении ПАА, и концентрацией флокулянта. При концентрации ПАА от 5 до 80 мг/г СВ наблюдалось четкое разделение флоккул и прозрачной жидкой фазы, в то время как при концентрации 200–400 мг/г СВ жидкая фаза становилась мутной и слегка окрашенной в коричневатый цвет. Следует отметить, что флокулянт в данном эксперименте вносили во все образцы в сухом виде, а не в виде 1% раствора. Мы полагаем, что концентрация флокулянта 200 и 400 мг/г СВ была слишком велика и часть сброженного осадка (инокулят) не агрегировалась в виде флоккул и осталась в полимерном матриксе, образовавшемся в жидкой фазе.

Полученные результаты позволили сформулировать гипотезу о том, что в образцах, содержащих флокулянт, происходили два противоположных процесса: 1) частичное разложение ПАА, в результате которого в среду выделялись продукты, которые являются предшественниками метана (ЛЖК, H_2 , CO_2) или стимулируют развитие микроорганизмов (аммоний в небольших концентрациях); 2) ингибирование микроорганизмов метаногенного сообщества за счет добавления флокулянта.

Возможность частичной биodeградации ПАА в анаэробных условиях была показана в ряде работ (Dai et al., 2014; Dai et al., 2015; Song et al., 2017; Wang et al., 2018). ПАА может быть использован анаэробными микроорганизмами в качестве источника азота и даже углерода в отсутствие альтернативных источников (Kay-Shoemake et al., 1998; Dai et al., 2015). Термофильные условия (50–55°C) способствуют частичной деполимеризации ПАА, что повышает его доступность для микроорганизмов и степень биodeградации (Song et al., 2017). Некоторые исследователи утверждают, что ПАА устойчив к микробному разложению из-за своей полимерной структуры и большого молекулярного веса, а также устойчивости образующихся в результате обработки флоккул к воздействию гидролаз (El-Mamouni et al., 2002; Chu et al., 2003).

Незначительная разница в конечном выходе метана и протекании процесса не позволяет утверждать, что ПАА был использован в качестве источника углерода или азота в ходе анаэробного процесса. Выход метана при разложении ПАА в качестве единственного субстрата составляет 80–110 мл/г ПАА (Dai et al., 2014). Количество ПАА в наших экспериментах составляло от 0,002 до 0,148 г ПАА в зависимости от концентрации, соответственно, теоретический объем метана, который может быть образован из ОВ ПАА, составляет от 0,16 мл до 16,28 мл. При этом для Б_5 этот объем метана составляет не более 0,17% метана с учетом ОВ ПАА. Для более точной оценки анаэробной биоразлагаемости ПАА в качестве инокулята необходимо использовать более глубоко выброженный осадок. Использованный в

эксперименте инокулят был недостаточно выброжен, что подтверждалось активным выделением метана в контрольных образцах без добавления ПАА в качестве субстрата. В присутствии более легкоразлагаемого субстрата, анаэробное разложение ПАА с выделением метана могло оказаться низким.

Тем не менее, косвенные данные, а именно более высокие по сравнению с контролем концентрации ЛЖК и аммония в образцах Б_200 и Б_400 позволяют предполагать, что частичный гидролиз ПАА происходил в ходе эксперимента. Полученные данные не согласуются с наблюдениями Даи с соавт., которые показали, что биологический гидролиз ПАА происходил при его концентрации в среде 100–200 мг/л, но при концентрации ПАА выше 300 мг/л эффективность гидролиза резко снижалась (Dai et al., 2015). В наших экспериментах концентрация ПАА до 200 мг/л была только в образцах Б_5 и составляла 37 мг/л. Для Б_40, Б_80, Б_200 и Б_400 концентрация флокулянта составляла 296, 592, 1482 и 2964 мг/л, соответственно.

Для определения токсичности полиакриламидного флокулянта для микроорганизмов метаногенного сообщества использовали смесь простых субстратов: ацетата, пропионата и бутирата в соотношении, которое наблюдали при разложении смеси пищевых отходов и ОСВ в предыдущих экспериментах (серия Т). Результаты эксперимента представлены на рис. 7 и в табл. 22.

Концентрация флокулянта до 40 мг/г СВ ингибирующего действия на процесс анаэробного сбраживания простых органических субстратов не оказывала, а, наоборот, стимулировала процесс (рис. 7). Выход биогаза в Т_5 и Т_40 в конце эксперимента был выше на 8,8% и на 6,6% по сравнению с контролем без ПАА, соответственно, при этом максимальная скорость метаногенеза в Т_5 и контроле была идентичная, а в Т_40 на 5,9 мл/сут (6,3%) ниже.

Наиболее выраженный ингибирующий эффект наблюдали в образцах Т_400 – снижение начальной скорости метаногенеза на 76,5%, однако следует отметить, что после 15 сут культивирования наблюдали значительное ускорение процесса, и к концу эксперимента выход метана в образцах Т_400 был выше, чем в образцах Т_200 и составлял 86,3% от контрольного. Несмотря на сильное ингибирующее действие, даже максимальная концентрация ПАА 400 мг/г СВ не приводила к полной дестабилизации метаногенеза при использовании ЛЖК в качестве субстратов. Полученные результаты подтверждают данные других исследователей, согласно которым ПАА-флокулянты не обладают токсичностью при концентрации 105 мг/г СВ и 415 мг/г СВ в мезофильных условиях (Chu et al., 2003; Campos et al., 2008).

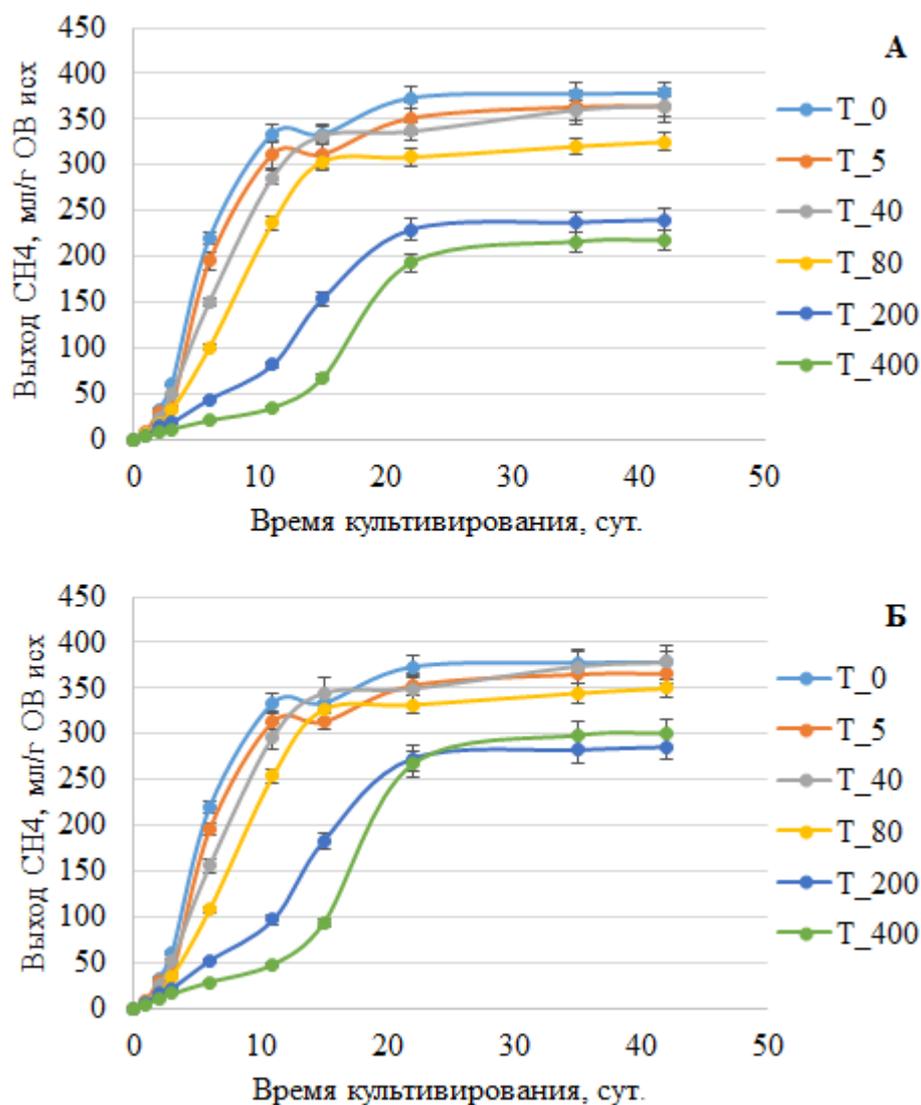


Рис. 7. Накопление метана в тесте на токсичность полиакриламидного флокулянта (ПАА): А – с учетом ОВ внесенного ПАА, Б – без учета ОВ внесенного ПАА (учтено ОВ сброженного ОСВ и ОВ ЛЖК).

За первые 6 сут эксперимента в образцах T_0, T_5, T_40 и T_80 потребилось 74,04, 64,62, 43,08 и 38,27% субстратов, соответственно (без учета образовавшихся при разложении осадка ЛЖК) (табл. 22). В образцах T_200 наблюдали незначительное потребление ацетата (4,7%), при этом концентрации пропионата и бутирата увеличивались. В образцах T_400 потребления ацетата не происходило, при этом концентрация пропионата, бутирата и суммарная концентрация ЛЖК возрастала. Медленнее всего разлагался пропионат, который к 22 сут был потреблен только в образцах T_0 и T_5, а во всех остальных его концентрация снизилась незначительно.

Таблица 22. Изменение концентраций летучих жирных кислот и аммония в ходе культивирования смесей сброженного осадка с разными концентрациями полиакриламидного флокулянта с добавлением смеси ЛЖК в качестве субстрата.

Образец	Сутки культивирования	Концентрация ЛЖК				Концентрация аммония, мг/л
		Ацетат, мМ	Пропионат, мМ	Бутират, мМ	Суммарная, г/л	
Т_0	0	44,871	6,965	22,783	5,20	35,2
	6	18,617	3,289	0,159	1,35	36,5
	22	1,705	0,015	0,025	0,10	–
	42	0,512	0,003	0,007	0,03	76,5
Т_5	0	44,871	6,965	22,783	5,20	35,2
	6	24,986	4,186	0,696	1,84	58,4
	22	3,343	0,020	0,051	0,20	–
	42	0,011	0,003	0,004	0	89,6
Т_40	0	44,871	6,965	22,783	5,20	35,2
	6	35,412	6,566	4,472	2,96	44,2
	22	0,429	6,712	0,053	0,52	–
	42	6,170	0,026	0,007	0,37	100,3
Т_80	0	44,871	6,965	22,783	5,20	35,2
	6	33,418	6,386	8,896	3,21	68,2
	22	0,524	6,610	0,030	0,52	–
	42	4,822	2,884	0,005	0,49	103,2
Т_200	0	44,871	6,965	22,783	5,20	35,2
	6	42,764	9,203	24,309	5,31	61,8
	22	0,362	7,214	0,070	0,55	–
	42	3,211	4,444	0,012	0,51	104,8
Т_400	0	44,871	6,965	22,783	5,20	35,2
	6	44,671	8,234	26,129	5,51	101,4
	22	12,164	8,250	0,192	1,34	–
	42	0,475	8,307	0,004	0,63	131,7

К моменту окончания эксперимента (42 сут) пропионат был полностью потреблен в образцах Т_40 и Т_80, на 51,7% в образцах Т_200. Концентрация пропионата в образцах Т_400 осталась неизменной. Это свидетельствует о том, что высокие концентрации ПАА-флокулянта оказывают ингибирующее действие на синтрофных бактерий, участвующих в процессе преобразования ЛЖК. Вероятнее всего, неблагоприятное действие на микроорганизмы оказывают образующиеся при разложении ПАА-флокулянта интермедиаты, такие как полиакриловая и акриловая кислота и акриламид, являющиеся достаточно сильными ингибиторами (Wang et al., 2018). При этом непосредственно флокулянты на основе ПАА обладают низкой токсичностью для анаэробных микроорганизмов (Campos et al., 2008).

Более высокий выход метана в образцах Т_5 и Т_40 по сравнению с контролем может косвенно свидетельствовать о том, что наличие альтернативных субстратов для роста микроорганизмов (в нашем случае ЛЖК) способствует разложению ПАА. Показано, что при

добавлении альбумина или крахмала к осадку, обработанному ПАА-флокулянт, удавалось достичь разложения 67–69% ПАА за 17 сут (Dai et al., 2015). Тем не менее, минерализации (постадийного разложения вплоть до образования метана) ПАА не происходило, деградация останавливалась на образовании различных промежуточных продуктов (Song et al., 2017; Wang et al., 2018).

Полученные результаты показывают, что ингибирующий эффект высоких концентраций ПАА связан преимущественно с нарушением гидролиза сложных биополимеров и нарушением массопереноса, а также влиянием на пропионат-окисляющих синтрофных бактерий, и в меньшей степени с влиянием на других синтрофных бактерий и метаногенных архей. Результаты не согласуются с данными Ванга с соавт., которые показали, что именно метаногены является наиболее чувствительной к повышению концентрации ПАА группой микроорганизмов, участвующих в процессе анаэробной деградации ОСВ (Wang et al., 2018). При этом промежуточные продукты разложения ПАА (полиакриловая кислота и акриламид) обладают значительно более выраженным ингибирующим воздействием на метаногенов (Wang et al., 2018).

Таким образом, в ходе экспериментов не удалось однозначно доказать, что исследуемый флокулянт на основе полиакриламида (ПАА) разлагается микроорганизмами метаногенного сообщества с образованием метана. Показано, что ПАА в концентрации до 80 мг/г СВ не оказывает существенного ингибирующего действия на процесс сбраживания простых органических субстратов (ЛЖК). Наиболее вероятными механизмами ингибирования анаэробной метаногенной ферментации являются нарушение гидролиза биополимеров и влияние на синтрофных бактерий, окисляющих пропионат.

Исходя из данных о выходе метана и содержании ЛЖК в жидкой фазе, можно сделать вывод об ухудшении массопереноса вследствие добавления ПАА. Это в том числе отражалось в снижении скорости потребления ЛЖК при увеличении концентрации ПАА в среде (табл. 22), вероятно, из-за увеличения размеров образовавшихся флоккул и снижения скорости диффузии ЛЖК во флоккулы и потребления ЛЖК метаногенным сообществом, заключенным во флоккулах. Это свойство было подтверждено в следующих экспериментах и использовалось для восстановления метаногенеза при кислотогенной дестабилизации.

Эксперимент 3. Влияние концентрации флокулянта на анаэробное сбраживание смеси ОСВ при оптимальном соотношении И/С (55/45).

Для изучения влияния катионного полиакриламидного флокулянта на процесс термофильного анаэробного сбраживания высокоуплотненных ОСВ, провели эксперименты с

добавлением различных концентраций ПАА от 5 до 40 мг/г СВ при оптимальном соотношении И/С. Результаты эксперимента представлены в табл. 23 и на рис. 8.

Концентрация ЛЖК не превышала 0,35 г/л (максимальная на 3–4 сут) и значение рН во всех образцах составляло 7,3–7,5, что свидетельствовало о стабильности процесса термофильного сбраживания обработанных флокулянтам ОСВ.

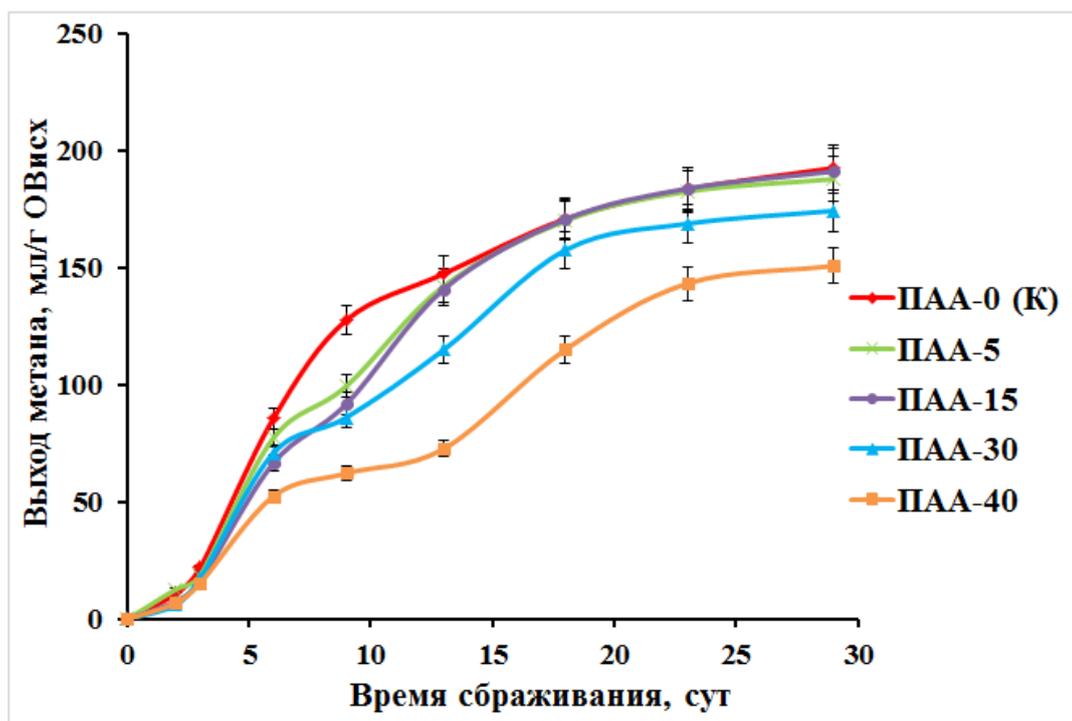


Рис. 8. Динамика накопления метана при сбраживании смеси ОСВ, обработанных различными концентрациями катионного полиакриламидного флокулянта Праэстол (ПАА-5 – ПАА-40), при оптимальном соотношении инокулята к субстрату (И/С 55/45).

Согласно рис. 8, даже минимальные концентрации ПАА (5–15 мг/г СВ), оказывают неблагоприятное воздействие на метаногенез. Такие концентрации флокулянтов обычно используются на практике в России (<http://www.mosvodokanal.ru>). Т.е. при обработке сфлокулированных ОСВ в производственных метантенках возможно снижение скорости метаногенеза, особенно при сниженном времени удержания (ГВУ) и высокой нагрузке. Однако, после 13 сут сбраживания разница между выходом метана и скоростью его образования в образцах с содержанием 5 и 15 мг ПАА/г СВ по сравнению с контролем (необработанная флокулянтам сбраживаемая смесь) становится незначительной (2,5% для ПАА-5 и 0,8% для ПАА-15 на 29 сут). Более выраженное ингибирование наблюдали при концентрации ПАА 30 и 40 мг/г СВ, которое привело к снижению выхода метана на 22,0 и 50,7% в первые 13 сут сбраживания. В дальнейшем наблюдали снижение ингибирующего воздействия, и конечный

выход метана составлял 91,5 и 78,3% по сравнению с необработанным контролем (рис. 8, табл. 23).

Таблица 23. Характеристики процесса анаэробного сбраживания смеси ОСВ, обработанных различными концентрациями флокулянта в конце эксперимента (после 29 сут сбраживания) при оптимальном соотношении И/С (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	Свободный аммонийный азот, мг/л	pH
0 (контроль)	192,6±5,7	34,3	0,12±0,01	650±19	57,2±1,7	7,5
5	187,8±5,6	29,9	0,15±0,01	1220±36	86,8±2,6	7,4
15	191,1±5,7	29,5	0,21±0,01	1423±42	125,1±3,7	7,5
30	174,3±5,2	31,5	0,19±0,01	970±29	55,6±1,6	7,3
40	150,8±4,5	36,0	0,20±0,01	1060±31	60,8±1,8	7,3

Полученные результаты согласуются с данными Чу с соавт., которые установили, что при сбраживании обработанных анионным и неионогенным флокулянтами на основе ПАА (15–40 мг/г СВ) ОСВ выход биогаза снижается на 23–47% (Chu et al., 2005). Кампос с соавт. также наблюдали снижение скорости метаногенеза и выхода биогаза при сбраживании осадка, обработанного катионным ПАА-флокулянтом (10–14 мг/г СВ) (Campos et al., 2008). Ингибирование, описанное Кампос с соавт., было существенно сильнее, чем в наших экспериментах, а метаногенез не восстанавливался со временем (Campos et al., 2008). Авторы использовали в качестве субстрата не ОСВ, а жидкий свиной навоз, при сбраживании которого выделялось большое количество аммонийного азота (ОАА: 3,3–6,5 г/кг, САА: 246–387 мг/мг) (Campos et al. 2008). Полученные нами результаты противоречат данным Болзонелла с соавт., которые установили, что Праэстол в концентрации 5 и 15 мг/г СВ не оказывает негативного воздействия на процесс сбраживания ОСВ в мезофильных условиях (Bolzonella et al., 2005). Несмотря на то, что выход метана в образцах ПАА–5 и ПАА–15 был практически равен выходу метана в контрольных образцах, необходимо отметить, что в реально работающих термофильных реакторах ГВУ существенно меньше 30 сут, поэтому принципиальное значение в данном случае имеет снижение начальной скорости метаногенеза.

На рис. 8 в образцах ПАА–30 и ПАА–40 видно наличие двух последовательных фаз продукции метана: первая наблюдается на 1–7 сут, вторая – после 13 сут сбраживания. В образцах ПАА–5 и ПАА–15 разделение этих фаз менее заметно. Наличие этих фаз связано с образованием и последующим частичным разрушением флоккул. В образцах, обработанных высокими концентрациями ПАА, отмечалось разделение сбраживаемой смеси на две фракции: жидкую фазу и осевшие флоккулы. После 10 сут сбраживания флоккулы начали постепенно разрушаться, становясь более рыхлыми, при этом жидкая фракция становилась более

темноокрашенной. Окрашивание жидкой фракции, вероятнее всего, связано с частичным выходом ОВ из флоккул, что в свою очередь делает ОВ более доступным для микроорганизмов метаногенного сообщества.

Низкие скорости образования метана в образцах с ПАА–30 и ПАА–40 могут быть связаны с: 1) ингибированием гидролиза за счет агрегации и снижения площади доступной поверхности частиц субстрата, 2) замедлением массопереноса в связи с увеличением размера частиц и отсутствием регулярного перемешивания, 3) непосредственным ингибированием сбраживания полиакриламидом или продуктами его частичного разложения, 4) ингибированием на других стадиях процесса.

Экспериментально подтверждено, что в хорошо сфлуккулированных осадках наблюдается образование плотных устойчивых флоккул, затрудняющих массоперенос, что делает недоступным субстрат, находящийся внутри флоккул для анаэробного сбраживания (Chu et al., 2003). В образцах ПАА–30 и ПАА–40 показано, что на 3–9 сут концентрация общего аммонийного азота была на 12,4–35,4% ниже, чем в контроле, что свидетельствует о менее активном гидролизе азотсодержащих биополимеров (белков, нуклеиновых кислот) в обработанных флокулянтами ОСВ. Диффузия крупных молекул, образующихся при гидролизе биополимеров, внутрь флоккул и из них для дальнейшего разложения бактериями занимает значительно больше времени, что приводит к снижению скорости процесса (Chu et al., 2003). Известно также, что при высокой концентрации флокулянты на основе ПАА способны образовывать на поверхности микроорганизмов своеобразную полимерную сеть, которая препятствует их нормальному функционированию (Campos et al., 2008). Регулярное перемешивание способствует более быстрому разрушению флоккул и улучшает массоперенос (Bolzonella et al., 2005). Доказано, что флокулянты на основе ПАА не обладают токсичностью при концентрации до 105 мг/г СВ (Chu et al., 2003) и 415 мг/г СВ (Campos et al., 2008). Так как используемые в нашем эксперименте концентрации были существенно ниже, то непосредственное ингибирование ПАА-флокулянтами не могло быть причиной снижения скорости и выхода метана. Концентрация ЛЖК, уровень рН, концентрация общего и свободного аммонийного азота в течение эксперимента не превышали оптимальных значений, процесс протекал стабильно. Учитывая экспериментальные и литературные данные, наиболее вероятными причинами низкой скорости образования метана считаем затрудненный гидролиз и массоперенос, связанные со специфической структурой флоккул и отсутствием постоянного перемешивания.

Таким образом, что при оптимальном соотношении И/С (55/45) и повышенной нагрузке (7–8% СВ) использование ПАА-флокулянта приводило к снижению скорости метаногенеза, при этом процесс оставался стабильным. Образовавшиеся флоккулы через 10–13 сут начинали

постепенно разрушаться, поэтому при ГВУ более 15 сут концентрация ПАА до 15 мг/г СВ не оказывала неблагоприятного влияния на выход метана. Активное перемешивание могло бы ускорить разрушение флоккул, способствуя увеличению выхода и скорости образования метана.

Эксперимент 4. Влияние концентрации флокулянта на анаэробное сбраживание смеси ОСВ при сниженном соотношении И/С (40/60).

На практике возможны ситуации, которые могут привести к дестабилизации термофильного сбраживания, например, резкое снижение температуры или скачок нагрузки по субстрату. Чтобы показать, каким образом обработка флокулянта повлияет на процесс сбраживания в условиях перегрузки по субстрату, был проведен эксперимент со сниженным (неблагоприятным) соотношением И/С (40/60), который должен был привести к дестабилизации процесса. Подобные исследования ранее не проводились. Результаты эксперимента представлены на рис. 9 и в табл. 24.

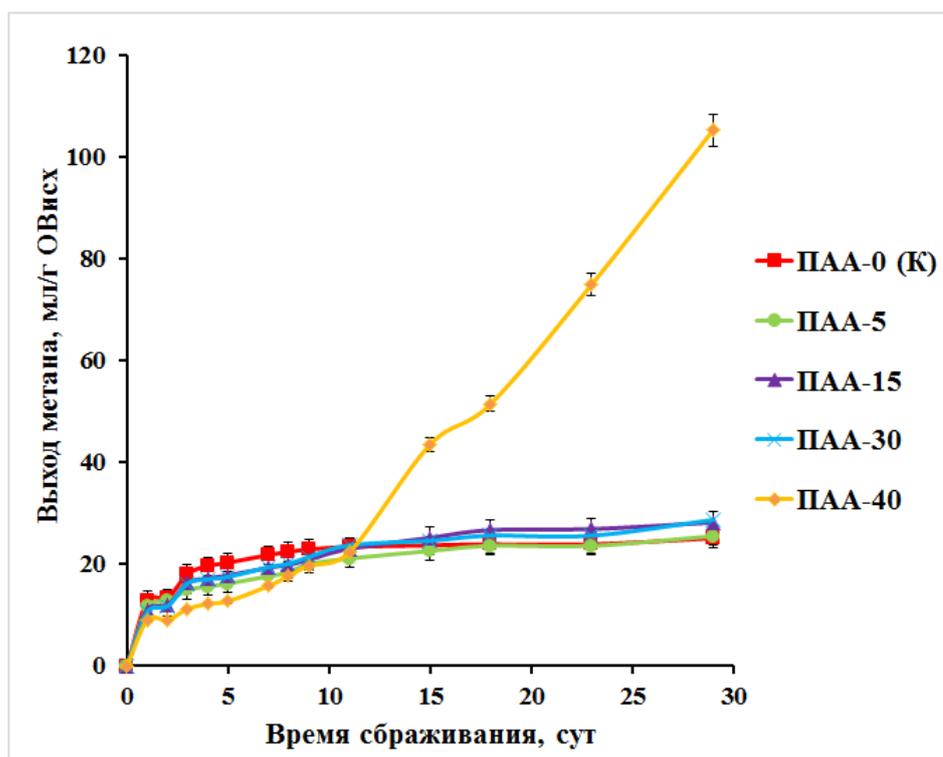


Рис. 9. Динамика накопления метана при сбраживании смеси ОСВ, обработанных различными концентрациями катионного полиакриламидного флокулянта Праэстол (ПАА-5 – ПАА-40), при сниженном соотношении инокулята к субстрату (И/С 40/60).

Как и ожидалось, термофильный процесс во всех смесях был нестабилен, характеризовался низкой метаногенной активностью. Деструкция ОВ происходила до

кислотогенной фазы, но интермедиаты в биогаз не преобразовывались. В результате уже на 4 сут во всех смесях накопилось 8,9–11,9 г/л ЛЖК (ацетат, пропионат и бутират), а на 11 сут концентрация ЛЖК возросла до 15,4–17,1 г/л. Также наблюдали накопление молекулярного водорода до 5–7% в газовой фазе. Это привело к снижению pH до 5,5–6,5 и дестабилизации процесса. Концентрация общего аммонийного азота (ОАА) в контрольных образцах (ПАА–0) и смесях ПАА–5 была существенно выше, чем в остальных смесях. Схожая динамика наблюдалась в течение всего эксперимента. Повышение концентрации аммонийного азота в жидкой фазе может служить показателем разложения белковых компонентов сбраживаемой смеси. Т.е. на начальных этапах сбраживания гидролиз биополимеров более активно проходил в смесях, не обработанных ПАА и обработанных минимальной (5 мг/г СВ) концентрацией ПАА. После 4–5 сут сбраживания концентрация ОАА во всех образцах, кроме ПАА–40 изменилась незначительно ($\pm 5\%$), в то время как в образцах ПАА–40 в период с 11 по 15 сут концентрация ОАА возросла на 27,8%. Некоторое количество аммония могло также образоваться при частичной деградации ПАА (Dai et al., 2015). Низкий уровень pH препятствовал преобразованию ионов аммония в свободный аммиак, что позволяет исключить ингибирование процесса за счет свободного аммонийного азота (САА).

Таблица 24. Характеристики процесса анаэробного сбраживания смеси ОСВ, обработанных различными концентрациями флокулянта в конце эксперимента (после 29 сут сбраживания) при сниженном соотношении И/С (40/60).

Концентрация ПАА, мг/г СВ	Выход CH_4 , мл/г ОВ	Разложение ОВ, %	Концентрация ЛЖК, г/л экв. ацетата	Общий аммонийный азот, мг/л	Свободный аммонийный азот, мг/л	pH
0 (контроль)	25,1 \pm 0,7	31,2	15,26 \pm 0,45	2115	20,2	6,5
5	25,5 \pm 0,7	30,6	14,17 \pm 0,42	1941	1,9	5,5
15	28,2 \pm 0,8	36,9	13,36 \pm 0,40	1039	1,0	5,5
30	28,7 \pm 0,8	32,1	14,16 \pm 0,42	1051	1,0	5,5
40	105,3 \pm 3,1	37,5	0,33 \pm 0,01	1412	71,4	6,9

Как и в предыдущем эксперименте, наблюдали снижение начальной скорости метаногенеза. Выход метана в первые 5 сут сбраживания снизился на 12,3–20,2% в смесях ПАА–5, ПАА–15 и ПАА–30, в то время как в смесях ПАА–40 выход метана снизился на 37,4% по сравнению с необработанным контролем. Полученные данные согласуются с результатами Чу с соавт., которые наблюдали снижение продукции метана на 23 и 38% при сбраживании ОСВ, обработанных флокулянтом в концентрации 15 и 40 мг/г СВ, соответственно (Chu et al., 2003; Chu et al., 2005). Через 11 сут сбраживания выход метана во всех смесях был практически одинаков (рис. 9).

Интересно, что, несмотря на ингибирующие концентрации ЛЖК и низкий рН, в образцах, обработанных наибольшей концентрацией флокулянта (ПАА–40), после 11 сут сбраживания начался активный метаногенез (рис. 9). К 24 сут сбраживания концентрация ЛЖК снизилась до 4,5 г/л, водорода – до 0,15%, уровень рН увеличился до 6,3. В конце эксперимента выход метана в смесях ПАА–40 составил 105,3 мл/г ОВ исх. Вероятнее всего, такой феномен связан с формированием крупных (2–3 мм в диаметре) и плотных флоккул.

Размер и морфология флоккул напрямую зависела от концентрации флокулянта: чем выше концентрация, тем крупнее и плотнее флоккулы (рис. 10). 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 тонким слоем. Образующиеся при оптимальном соотношении И/С (55/45) флоккулы были меньше по размеру и менее плотные.

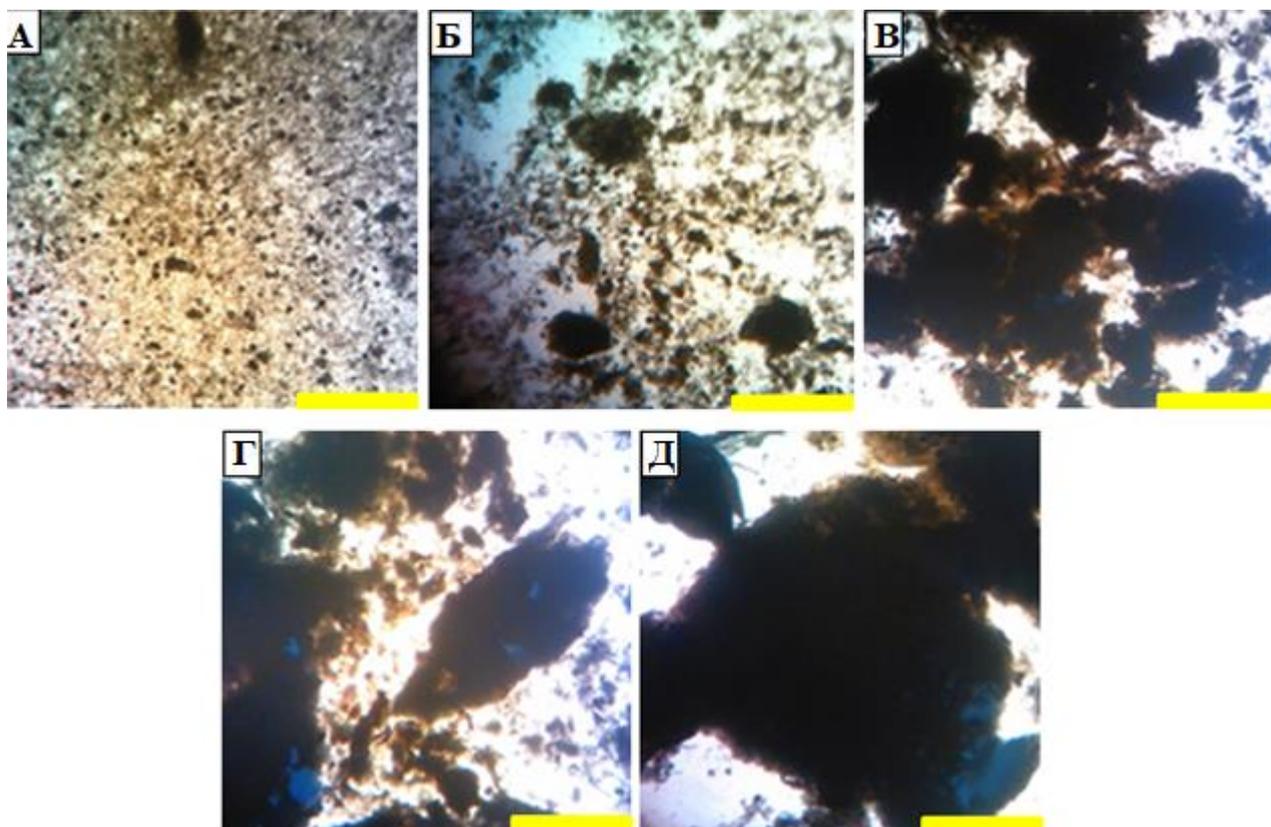


Рис. 10. Морфология флоккул до анаэробного сбраживания. Световая микроскопия (Bresser, 20x). (А) контроль – сбраживаемая смесь, не обработанная ПАА, (Б-Д) сбраживаемые смеси, обработанные различными концентрациями ПАА: (Б) 5 мг/г СВ, (В) 15 мг/г СВ, (Г) 30 мг/г СВ, (Д) 40 мг/г СВ. Маркер масштаба – 1 мм.

По всей видимости, образование более плотных и крупных флоккул связано с более высокой концентрацией ОВ субстрата, т.к. все прочие параметры оставались неизменными.

Несмотря на то, что спустя месяц флокулы в образцах ПАА-40 частично разрушились, стали более рыхлыми, они не потеряли своей структуры. Это позволяет предположить, что они выполняли защитную функцию для микроорганизмов в неблагоприятных условиях высокой концентрации ЛЖК и низкого рН. Известно, что уровень рН, близкий к 5,5–6,0, наиболее благоприятен для гидролиза и кислотогенеза (Ponsa et al., 2008). Часть субстрата, находящаяся внутри флокул, оказалась недоступна для микроорганизмов, что также сыграло косвенную защитную роль.

Принудительное концентрирование биомассы в крупные флокулы привело к ухудшению массопереноса и формированию физического барьера и градиента таких метаболитов, как ЛЖК и аммоний. Поэтому, возможно, что, несмотря на высокую концентрацию ЛЖК в жидкой фракции и внешнем слое флокул, во внутренних слоях флокул сохранились условия, более благоприятные для микроорганизмов метаногенного сообщества.

Влияние флокулянтов на процесс анаэробного сбраживания в условиях ингибирования, например, высокой концентрацией ЛЖК и высокой кислотностью среды, ранее не изучалось. Однако широко известен факт, что микроорганизмы метаногенного сообщества тяготеют к естественной агрегации в консорциумы и гранулы, имеющие уникальную пространственную структуру (Stams et al., 2012). Гранулированный метаногенный ил обладает большей устойчивостью к неблагоприятным факторам и большей производительностью (Stams et al., 2012). Обнаруженный позитивный эффект принудительной агрегации биомассы позволяет предположить, что обработка ПАА-флокулянтами в концентрации 40 мг/г СВ может быть использована в качестве способа восстановления метаногенеза в реакторах, дестабилизированных за счет накопления высоких концентраций ЛЖК.

Таким образом, при сниженном соотношении И/С наблюдается более выраженное ингибирующее действие ПАА. Тем не менее, высокая концентрация ЛЖК и снижение рН являются факторами, оказывающими более выраженное неблагоприятное влияние на процесс метаногенеза. В ходе экспериментов был обнаружен интересный феномен – в обработанных высокой (40 мг/г СВ) концентрацией ПАА ОСВ через 11 сут самопроизвольно восстанавливался метаногенез. Гипотеза о том, что обнаруженный феномен может быть использован для восстановления метаногенеза в анаэробных биореакторах, дестабилизированных вследствие накопления высоких концентраций ЛЖК, нуждается в экспериментальной проверке.

Эксперимент 5. Использование флокулянта для восстановления метаногенеза в дестабилизированных реакторах.

С целью проверки возможности использования ПАА-флокулянта для восстановления метаногенеза в дестабилизированных из-за накопления высоких концентраций ЛЖК биореакторах был проведен следующий эксперимент. Сбраживанию подвергались смеси со сниженным соотношением И/С (30/70) и увеличенным количеством модельного первичного осадка в субстратной смеси с избыточным активным илом (45%/25%, соответственно, от общего ОВ смеси). Нагрузка составляла 40 г ОВ/кг сбраживаемой смеси при влажности 91,8±0,1%.

Процесс метаногенеза характеризовался существенным накоплением водорода в первые несколько сут эксперимента – 17,2±4,7% от объема газовой фазы, при этом в одном из образцов концентрация водорода достигала 56,6% на третьи сут, что свидетельствовало о дестабилизации процесса метаногенного сбраживания в результате создания избытка субстрата. Наблюдалось образование ЛЖК, особенно ацетата, концентрация которого за 3 сут возросла в 4,2–6,0 раз, при этом общая концентрация ЛЖК была относительно невысокой – 3,42±0,05 г/л. Во всех образцах происходило снижение рН: с 7,2 в начале эксперимента до 5,8±0,3 на 3–6 сут. Совокупность этих факторов привели к полному прекращению образования метана к 6 сут эксперимента.

На 7 сут эксперимента внесли раствор флокулянта (в контрольные образцы – дистиллированную воду), при этом влажность смеси возросла до 93,9±0,1%. Затем экспериментальные образцы разделили на 2 группы и продолжили сбраживание: 1) без перемешивания, 2) при перемешивании с интенсивностью 100 об/мин.

Динамика накопления метана представлена на рис. 11, динамика накопления и потребления ЛЖК – на рис. 12, характеристики процесса – в табл. 25.

Таблица 25. Характеристики процесса анаэробного сбраживания в смесях без перемешивания

Образцы	Концентрация ЛЖК, г/л		Концентрация аммония, мг/л		рН.	Выход метана, мл/г ОВ исх	Степень разложения ОВ, %
	Исходная	Конечная	Исходная	Конечная			
Контроль	2,23±0,11	11,75±0,58	60,7±3,0	822,1±41,1	5,68	11,16±0,55	35,0±1,7
ПАА–20	2,23±0,11	0,73±0,03	60,7±3,0	1047,2±52,3	7,60	189,84±9,54	60,4±3,0
ПАА–40	2,23±0,11	8,37±0,41	60,7±3,0	1033,0±51,6	6,89	53,41±2,67	52,6±2,6
ПАА–60	2,23±0,11	13,09±0,65	60,7±3,0	836,5±41,8	5,96	12,45±0,62	52,1±2,6

Положительная динамика накопления метана и снижения концентрации ЛЖК наблюдалась только в образцах без перемешивания. В образцах, обработанных ПАА в концентрации 20 мг/г СВ, восстановление процесса метаногенеза после дестабилизации

вследствие закисления началось через 4–5 сут. Незначительные положительные изменения начались в образцах ПАА–40 спустя 8 сут после обработки флокулянтom, однако существенный сдвиг отмечали только после 45 сут.

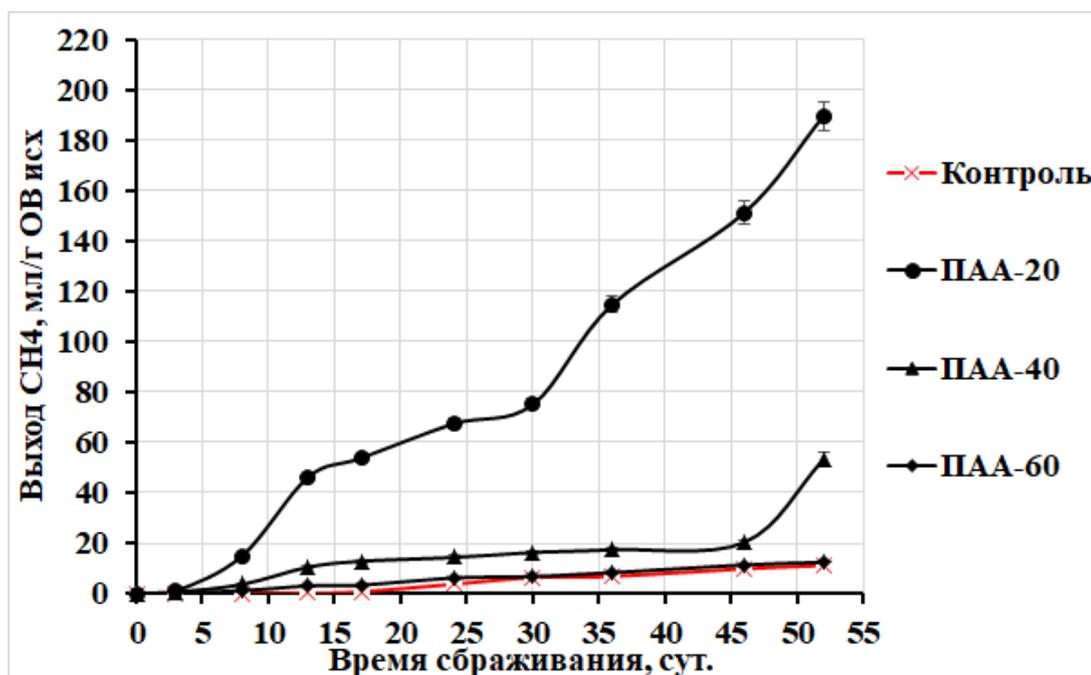


Рис. 11. Динамика накопления метана (мл/г ОВ исх) в нестабилизированных вследствие накопления высоких концентраций ЛЖК биореакторах без перемешивания после внесения различных концентраций ПАА-флокулянта для восстановления метаногенеза: Контроль – без добавления флокулянта, ПАА–20, ПАА–40 и ПАА–60 – концентрация флокулянта составляла 20, 40 и 60 мг/г СВ, соответственно.

На рис. 11 и 12 прослеживается корреляция между моментом активизации образования метана и началом снижения концентрации ЛЖК в среде. В смесях ПАА–20 концентрация ЛЖК достигает максимума и затем начинает снижаться через 5–7 сут после внесения флокулянта, что соответствует началу накопления метана. Схожие изменения наблюдались и в смесях ПАА–40 после 40 сут эксперимента. Потребление ЛЖК способствовало смещению рН в более нейтральную область (табл. 25). Уровень рН достиг оптимальных значений только в образцах ПАА–20. В смесях ПАА–60 и контролях суммарная концентрация ЛЖК продолжала расти вплоть до окончания эксперимента. При этом при близких средних концентрациях пропионата (22,4 и 23,0 мМ) и бутирата (70,4 и 73,4 мМ) в контрольных образцах и образцах ПАА–60, соответственно, концентрация ацетата в смесях ПАА–60 на $17,5 \pm 1,9$ мМ превышала концентрацию ацетата в контрольных образцах. Увеличение количества ацетата может быть

связано с частичным восстановлением активности синтрофных бактерий, преобразующих пропионат, бутират и другие ЛЖК в ацетат.

Концентрация образовавшегося в ходе сбраживания общего аммонийного азота (ОАА) не превышала 1,1 г/л и была максимальной в образцах ПАА-20 и ПАА-40. Возрастание концентрации ОАА свидетельствовало о процессах гидролиза белковых субстратов. Более низкие концентрации ОАА в образцах ПАА-60, вероятнее всего, связаны с ингибированием микроорганизмов сообщества, в т.ч. со снижением активности протеолитических бактерий за счет ухудшения массопереноса из-за флокулообразования.

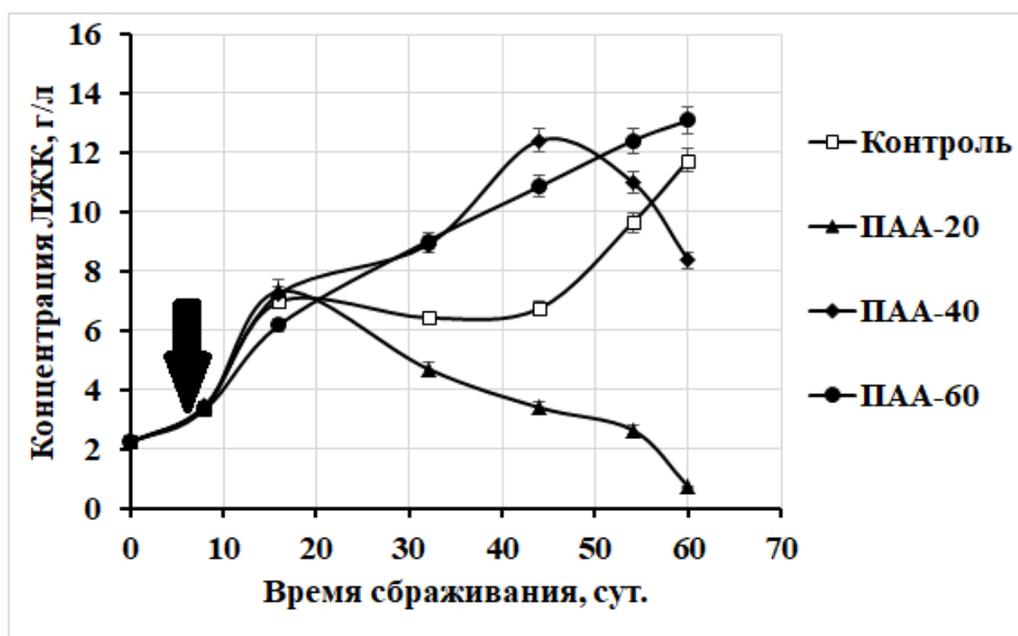


Рис. 12. Динамика накопления и потребления ЛЖК (сумма концентраций ацетата, пропионата и бутирата, г/л): Контроль – без добавления флокулянта, ПАА-20, ПАА-40 и ПАА-60 – концентрация флокулянта составляла 20, 40 и 60 мг/г СВ, соответственно. Стрелкой обозначен момент, когда был внесен флокулянт.

Степень разложения СВ составляла 20,1, 45,3, 38,5 и 36,5% для контролей и смесей ПАА-20, ПАА-40 и ПАА-60, соответственно. При этом степень разложения ОВ составляла от 35 до 60,4% в зависимости от смесей (табл. 25). Следует отметить, что продукты разложения ОВ субстратов не полностью преобразовывались в биогаз. Так, в контрольных смесях разложение ОВ останавливалось на образовании ЛЖК, этанола и других летучих продуктов брожения, однако дальнейшее преобразование этих соединений в метан не происходило в связи с ингибированием активности метаногенных архей.

Полученные результаты согласуются с данными Эл-Мамоуни с соавт., которые показали, что принудительная агрегация биомассы с помощью ПАА-флокулянта, аналогично

естественной агрегации, способствует увеличению метаногенной активности за счет сближения ацетогенных бактерий и метаногенных архей и ускорения использования ацетата и H_2 (El-Mamouni et al., 1998).

В смесях, сбраживаемых с перемешиванием, положительной динамики не наблюдали, образование метана не восстанавливалось вплоть до окончания эксперимента. При этом происходило накопление водорода до 9,7–11,9% через неделю после внесения флокулянта с дальнейшим уменьшением до 2,1–7,6% в конце эксперимента. Наименьшая концентрация водорода в газовой фазе наблюдалась в образцах ПАА–20. Концентрация ЛЖК в конце эксперимента составляла $9,54 \pm 0,15$ г/л. Накопление ЛЖК в образцах с перемешиванием происходило медленнее, а концентрация ЛЖК не достигла максимумов, наблюдаемых при сбраживании без перемешивания (12,4–13,1 г/л). Вероятнее всего, это связано с существенным ингибированием всех анаэробных процессов, в том числе кислотогенеза. Содержание аммония во всех смесях вне зависимости от количества добавленного ПАА составляло 1039–1083 мг $N-NH_4$ /л. Доля ОВ, разложившегося в ходе сбраживания, составляла около 40% в контрольных образцах и образцах ПАА–60, и около 45% – в образцах ПАА–20 и ПАА–40. В смесях, подвергающихся перемешиванию, наблюдали более быстрый распад флокул. Это соответствует данным Болзонелла и соавт., которые показали, что постоянное перемешивание сбраживаемой массы способствует быстрому разрушению сформировавшихся в ходе обработки флокулянтном флокул (Bolzonella et al., 2005).

Размеры и продолжительность существования образующихся флокул имеют критическое значение для восстановления процесса метаногенеза. Согласно полученным экспериментальным данным, добавление флокулянта в сухом виде не позволяет получить достаточно крупные и равномерные флокулы. Поэтому внесение ПАА необходимо проводить в виде 1,0–1,3% раствора, при этом необходимо следить, чтобы образующийся раствор был однородным. При концентрации ПАА в растворе выше 1,3% образующийся раствор имеет гелеобразную структуру, что не позволяет получить флокулы необходимой морфологии.

В ходе экспериментов наблюдали, что снижение рН при накоплении избыточного количества ЛЖК не оказывало влияния на последующий процесс флокуляции. Полученные результаты согласуются с данными Эл-Мамоуни с соавт., которые показали, что эффективность образования флокул ПАА не изменяется при снижении рН (El-Mamouni et al., 1998). Согласно данным Даи с соавт., размер образующихся при обработке ПАА флокул связан с рН среды: наиболее крупные флокулы образуются при нейтральном рН (7,0) и при снижении рН до 4,0, а при возрастании рН выше 8,0 размер флокул, напротив, снижается (Dai et al., 2015). Данная особенность имеет большое значение при использовании ПАА для восстановления метаногенеза в реакторах, дестабилизированных вследствие накопления ЛЖК, так как чем

крупнее образуются флокулы, тем более вероятен положительный эффект от применения флокулянта.

Таким образом, флокулянт на основе ПАА в концентрации 20 мг/г СВ может быть использован для восстановления метаногенеза в биореакторах, дестабилизированных вследствие накопления высоких концентраций ЛЖК. Однако следует полностью прекратить или снизить до возможного минимума перемешивание сбрасываемой смеси, чтобы увеличить продолжительность существования и избежать несвоевременной дезинтеграции флоккул.

Основные результаты и выводы по главе 4.2:

1) Для успешного запуска процесса анаэробного сбраживания высокоуплотненных ОСВ в лабораторных периодических реакторах необходимо использовать соотношение инокулята к субстрату не менее 55/45 в расчете на общее ОВ смеси.

2) В ходе экспериментов не удалось однозначно доказать, что исследуемый флокулянт на основе ПАА разлагается микроорганизмами метаногенного сообщества с образованием метана.

3) Концентрация флокулянта на основе ПАА до 80 мг/г СВ не оказывает существенного ингибирующего действия на процесс сбраживания простых органических субстратов. При концентрации ПАА 200–400 мг/г СВ наблюдали выраженное снижение скорости образования метана. Нарушение процесса гидролиза биополимеров и влияние на синтрофных бактерий, окисляющих пропионат, являются наиболее вероятными механизмами ингибирования анаэробного сбраживания.

4) При сбраживании ОСВ со сниженной влажностью (92–93%) при оптимальном соотношении И/С (55/45) использование ПАА-флокулянта из-за ухудшения массопереноса приводит к снижению скорости образования метана, без нарушения стабильности процесса. При времени удержания смеси в реакторе более 15 сут концентрация ПАА до 15 мг/г СВ не оказывает неблагоприятного влияния на выход метана.

5) При сниженном соотношении И/С наблюдается более выраженное ингибирующее действие ПАА. Концентрация ПАА 40 мг/г СВ способствует восстановлению метаногенеза, несмотря на высокую концентрацию ЛЖК (15,4–17,1 г/л) и неблагоприятный pH (5,5–6,5).

6) Добавление флокулянта на основе ПАА в концентрации 20 мг/г СВ приводит к восстановлению метаногенеза в биореакторах, дестабилизированных вследствие накопления высоких концентраций ЛЖК.

7) Отсутствие перемешивания, крупные размеры и длительный период существования флоккул, образующихся при внесении флокулянта, являются обязательными факторами, необходимыми для восстановления метаногенеза.

4.3 Совместное термофильное сбраживание ОСВ и ОФ-ТБО в лабораторном анаэробном биогазовом реакторе в непрерывных условиях

4.3.1 Запуск биогазового реактора и вывод на рабочий режим

Запуск анаэробного реактора считается сложной и долговременной процедурой, в особенности, в случаях, когда используемый инокулят не адаптирован к переработке сбраживаемого субстрата (Appels et al., 2008; Ike et al., 2010; Shah et al., 2014; Goux et al., 2016). Учитывая результаты предыдущих экспериментов, имеющиеся литературные и экспериментальные данные об инокуляте и сбраживаемых субстратах, а также особенности конструкции спроектированного биогазового реактора для его запуска использовали стратегию адаптации инокулята и постепенного увеличения нагрузки по субстрату. Весь объем метантенка изначально заполняли инокулятом, затем постепенно добавляли субстрат небольшими порциями. В начале эксперимента в качестве субстрата использовали только ОСВ (смесь первичного осадка и избыточного активного ила). Вывод биореактора на рабочий режим занял около 12 сут, образование биогаза составляло в среднем $1,2 \text{ м}^3/\text{м}^3 \text{ сут}$, с содержанием метана в биогазе около 60–65%. Короткий период вывода реактора на рабочий режим связан с использованием в качестве инокулята осадка метантенка, адаптированного к сбраживанию ОСВ в термофильных условиях, и правильно подобранной стратегии запуска. Стратегия постепенного увеличения нагрузки является самой эффективной для запуска анаэробных реакторов, сбраживающих ОФ-ТБО, а также при отсутствии адаптированного к определенному субстрату инокулята. Используя эту стратегию, Ангелидаки с соавт. удалось добиться стабильной работы реактора, перерабатывающего ОФ-ТБО, за 58 сут (Angelidaki et al., 2006). Для сравнения при использовании неадаптированного инокулята (коровьего навоза) вывод мезофильного реактора, сбраживающего сельскохозяйственные отходы, на стабильную работу с выходом метана $0,53\text{--}0,57 \text{ м}^3/(\text{м}^3 \text{ сут})$ занял 120 сут (Goux et al., 2016). С помощью многоступенчатой стратегии запуска Ву с соавт. удалось вывести термофильный биореактор, с ОСВ в качестве субстрата, на рабочий режим за 63 сут, используя в качестве инокулята уплотненный активный ил (Wu et al., 2011).

Разложение ОВ достигало около 40–42% при ГВУ 10 сут, что в целом характерно для лабораторных реакторов подобного типа. По данным Болзонелла с соавт., при термофильном сбраживании смеси ОСВ при ГВУ 20 сут разложение ОВ составляет 44–52% (Bolzonella et al., 2012).

В дальнейшем для увеличения выхода биогаза в качестве субстрата начали подавать смеси ОСВ и пищевых отходов (ПО), постепенно увеличивая долю ПО с 0 до 40%. Согласно результатам, приведенным в табл. 26 и на рис. 13, наиболее оптимальной для процесса

жидкофазной ко-ферментации являлась доля ПО в смеси, равная 20% или 30% по весу (соотношение ПО/ОСВ 40/60 или 55/45 по ОБ, соответственно). При добавлении 20% ПО к ОСВ удалось увеличить суточный выход биогаза на 75% и теплотворную способность биогаза, которая определяется содержанием метана, на 10–15% по сравнению со сбраживанием ОСВ. Распад ОБ субстрата также был выше при сбраживании смеси с содержанием ПО 20%. Вероятнее всего, добавление 20% ПО в качестве дополнительного субстрата позволило сбалансировать соотношение С/Н, что способствовало более глубокой деградации ОБ и увеличению доли метана в биогазе. Процесс проводили при нагрузке 4,54 кг ОБ/(м³ сут). Такая нагрузка считается благоприятной для термофильной ко-ферментации органических отходов (Schnurer, Jarvis, 2010; Duan et al., 2012; Mataalvarez et al., 2014; Wang et al., 2014).

Таблица 26. Параметры сбраживания смеси пищевых отходов и осадков сточных вод в лабораторном биогазовом реакторе.

Показатель	Доля ПО в смеси с ОСВ, % по весу (по ОБ)			
	0 (0)	20 (40)	30 (55)	40 (70)
Время удержания (ГВУ), сут	10			
Средняя влажность исходной смеси ОСВ и ПО, %	95,5	93,4	92,4	91,3
ОБ/СВ _{исх.} , %	65	68,8	70,7	72,6
Нагрузка по ОБ (OLR), кг ОБ / (м ³ сут)	2,92	4,54	5,37	6,31
Степень разложения ОБ, %	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 ОБ	0,267	0,347	0,352	0,322

Несмотря на то, что степень деградации ОБ и содержание метана в биогазе при сбраживании смеси ОСВ с содержанием ПО 30% были несколько ниже, но средний выход биогаза и выход метана в расчете на загруженное ОБ субстрата были выше, чем во всех прочих вариантах. Следует отметить, что процесс сбраживания проходил при сниженной влажности (92,4–93,4%) без нарушения стабильности, что на практике позволяет уменьшить объем реактора и снизить капитальные затраты на его постройку.

При дальнейшем увеличении доли ПО в субстратной смеси до 40% по весу (соотношение ПО/ОСВ 70/30 по ОБ) наблюдалось увеличение объемного выхода биогаза пропорционально нагрузке. При этом происходило снижение содержания метана в биогазе на 5–10% и снижение степени разложения ОБ субстрата. Поэтому выход метана, рассчитанный на ОБ поступившего субстрата, ниже, чем в других смесях. Снижение распада ОБ и содержания метана в биогазе,

вероятнее всего, связано с необходимостью более длительной адаптации метаногенного сообщества к увеличению нагрузки. Снижение влажности сбраживаемой смеси также могло быть одной из причин уменьшения степени распада ОВ и снижения гидролитической и метаногенной активности (Hidaka et al., 2013; Wang et al., 2014; Liotta et al., 2014).

Полученные результаты согласуются с данными других авторов. Kim с соавт. установили, что для термофильного процесса оптимальным является соотношение ПО/ОСВ 50/50 по ОВ, что приводит к выходу метана 0,28 л/г ОВ при ГВУ 12 сут (Kim et al., 2003). Однако нагрузка не превышала 2,0–4,0 г ОВ/л (Kim et al., 2003). Выход метана при сбраживании смеси ПО/ОСВ в соотношении 80/20 по весу с нагрузкой 5,2 г ОВ/л сут и ГВУ 15 сут составлял 0,407 л/г ОВ (Li et al., 2017). Высокому выходу метана способствовал эффективный способ загрузки субстрата и активное адаптированное к субстрату микробное сообщество (Li et al., 2017).

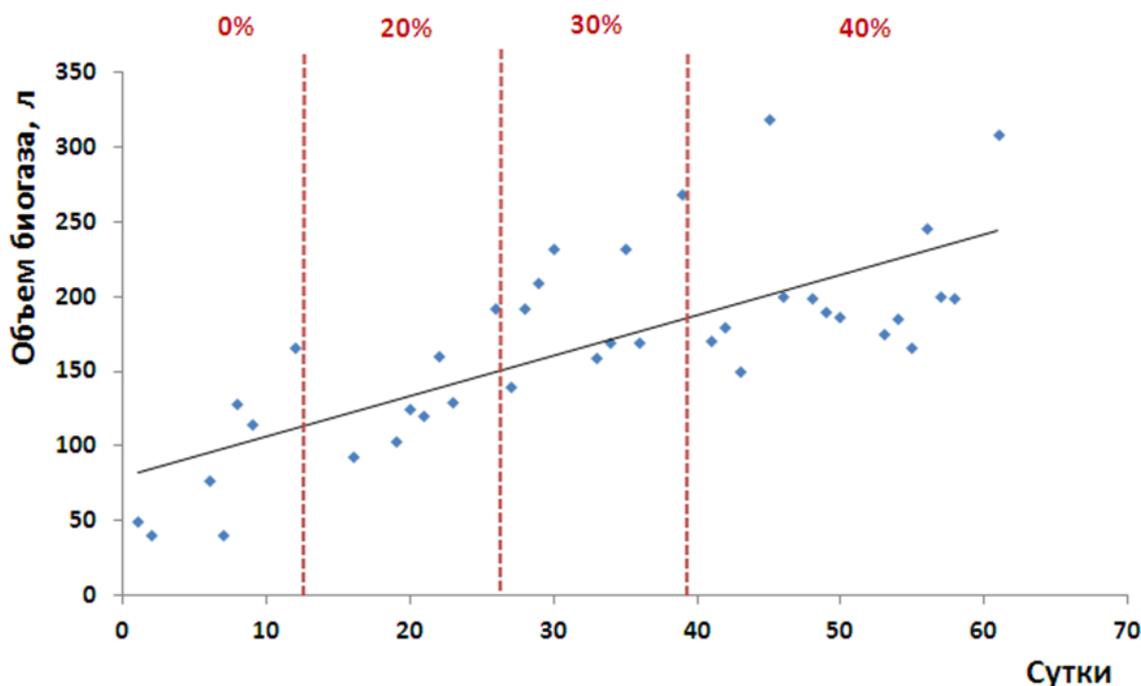


Рис. 13. Выход биогаза при увеличении доли пищевых отходов в сбраживаемой смеси.

Субстратная смесь в нашей работе подавалась в метантенк один раз в сут, что могло привести к снижению выхода биогаза. При сбраживании смеси ОСВ и ПО более частая загрузка порций субстрата, составляющих суточную нагрузку реактора, способствовала увеличению содержания метана в биогазе на 5% по сравнению с одномоментной загрузкой (Arhoun et al., 2013). При этом выход метана был выше, а процесс оставался стабильным при нагрузке выше 6 кг ОВ/(м³ сут) (Arhoun et al., 2013). Метод многократной загрузки (4 раза в ч) при сбраживании смеси ПО/ОСВ в соотношении 80/20 по весу позволил сократить ГВУ до 3 сут и добиться

стабильной работы реактора при нагрузке 30,2 г ОВ/(л сут) с выходом метана 0,34 л/г ОВ (Li et al., 2017).

4.3.2 Термофильная анаэробная ко-ферментация ОСВ и модельной ОФ-ТБО

Для отработки технологии и получения более достоверных результатов дальнейшие исследования проводили на модельной органической фракции твердых бытовых отходов (ОФ-ТБО), позволяющей унифицировать состав субстрата. Перевод биореактора на работу на ОФ-ТБО осуществляли постепенно.

Скорость образования биогаза в зависимости от соотношения субстратов в смеси и нагрузки. Изменение скоростей образования биогаза при термофильном сбраживании ОСВ и ОФ-ТБО в зависимости от соотношения субстратов в смеси и нагрузки по ОВ представлено на рис. 14 и в табл. 27. При нагрузке 3,19 кг ОВ/(м³ сут) наблюдали самую низкую скорость образования биогаза, которая составляла 1,43 м³/(м³ сут). Скорость образования биогаза возрастала при повышении нагрузки по ОВ и увеличении доли ОФ-ТБО, характеризующейся более высоким содержанием ОВ (табл. 27). Максимальная скорость образования биогаза составляла 4,1 м³/(м³ сут) при сбраживании ОФ-ТБО (100%) и содержанием СВ 10%, что соответствовало нагрузке 8,7 кг ОВ/(м³ сут).

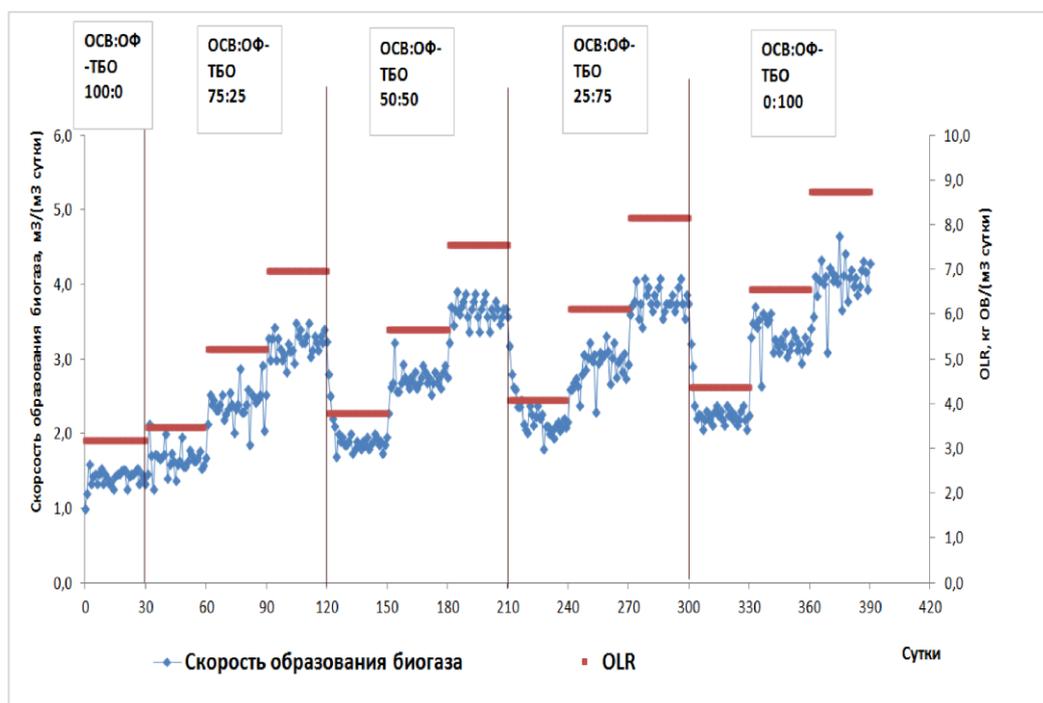


Рис. 14. Скорость образования биогаза в зависимости от соотношения осадков сточных вод и органической фракции ТБО в субстратной смеси и нагрузки по органическому веществу (OLR).

Таблица 27. Параметры анаэробной термофильной ко-ферментации осадков сточных вод и органической фракции ТБО.

Соотношение ОСВ/ОФ-ТБО	OLR, кг ОВ/ (м ³ сут)	Разложение ОВ, %	Скорость образования биогаза, м ³ / (м ³ сут)	Содержание СН ₄ в биогазе, %	Выход биогаза, м ³ / (кг ОВ _{исх})	Выход биогаза, м ³ / (кг ОВ _{уд})	Выход СН ₄ , м ³ / (кг ОВ _{исх})	Выход СН ₄ , м ³ / (кг ОВ _{уд})	pH	ХПК, г О ₂ /л	Концентрация N-NH ₄ , г/л	Концентрация ЛЖК, г/л	Щелочность, г/л CaCO ₃	ЛЖК/Щелочность
100/0	3,19	50,1	1,43	62,7	0,45	0,89	0,28	0,56	7,40	1,40	0,62	0,04	2,02	0,02
75/25	3,49	54,3	1,67	67,5	0,48	0,88	0,32	0,59	7,43	2,98	1,17	0,10	2,73	0,04
	5,23	53,3	2,42	66,3	0,46	0,87	0,31	0,58	7,41	3,59	1,27	0,15	3,14	0,05
	6,97	53,1	3,25	63,7	0,47	0,88	0,30	0,56	7,35	3,89	1,30	0,59	3,26	0,18
50/50	3,78	61,1	1,88	68,5	0,50	0,82	0,34	0,56	7,40	3,61	0,77	0,29	3,41	0,09
	5,67	59,3	2,73	69,3	0,48	0,81	0,33	0,56	7,35	4,82	0,80	0,16	3,43	0,05
	7,56	56,9	3,64	69,6	0,48	0,85	0,34	0,59	7,29	5,14	0,97	0,43	4,10	0,10
25/75	4,08	67,2	2,09	64,0	0,51	0,76	0,33	0,49	7,31	4,21	0,79	0,39	4,32	0,09
	6,11	65,6	3,00	63,7	0,49	0,75	0,31	0,48	7,24	5,29	0,81	0,66	4,68	0,14
	8,15	65,8	3,79	62,5	0,47	0,71	0,29	0,44	7,16	6,14	0,79	0,76	4,95	0,15
0/100	4,37	69,0	2,22	60,3	0,51	0,74	0,31	0,44	7,20	5,94	0,37	1,14	5,35	0,21
	6,56	68,1	3,18	59,9	0,49	0,71	0,29	0,43	7,15	6,87	0,42	2,08	5,65	0,37
	8,74	67,7	4,12	54,7	0,47	0,70	0,26	0,38	7,11	7,51	0,38	2,61	5,80	0,45

Прим.: измеренные значения являются средними в стационарной фазе (3 ГВУ).

Содержание метана в биогазе в зависимости от соотношения субстратов в смеси и нагрузки. Наибольшее (68,5–69,6%) содержание метана в биогазе наблюдалось при сбраживании смеси ОСВ/ОФ-ТБО в соотношении 50/50 (рис. 15, А).

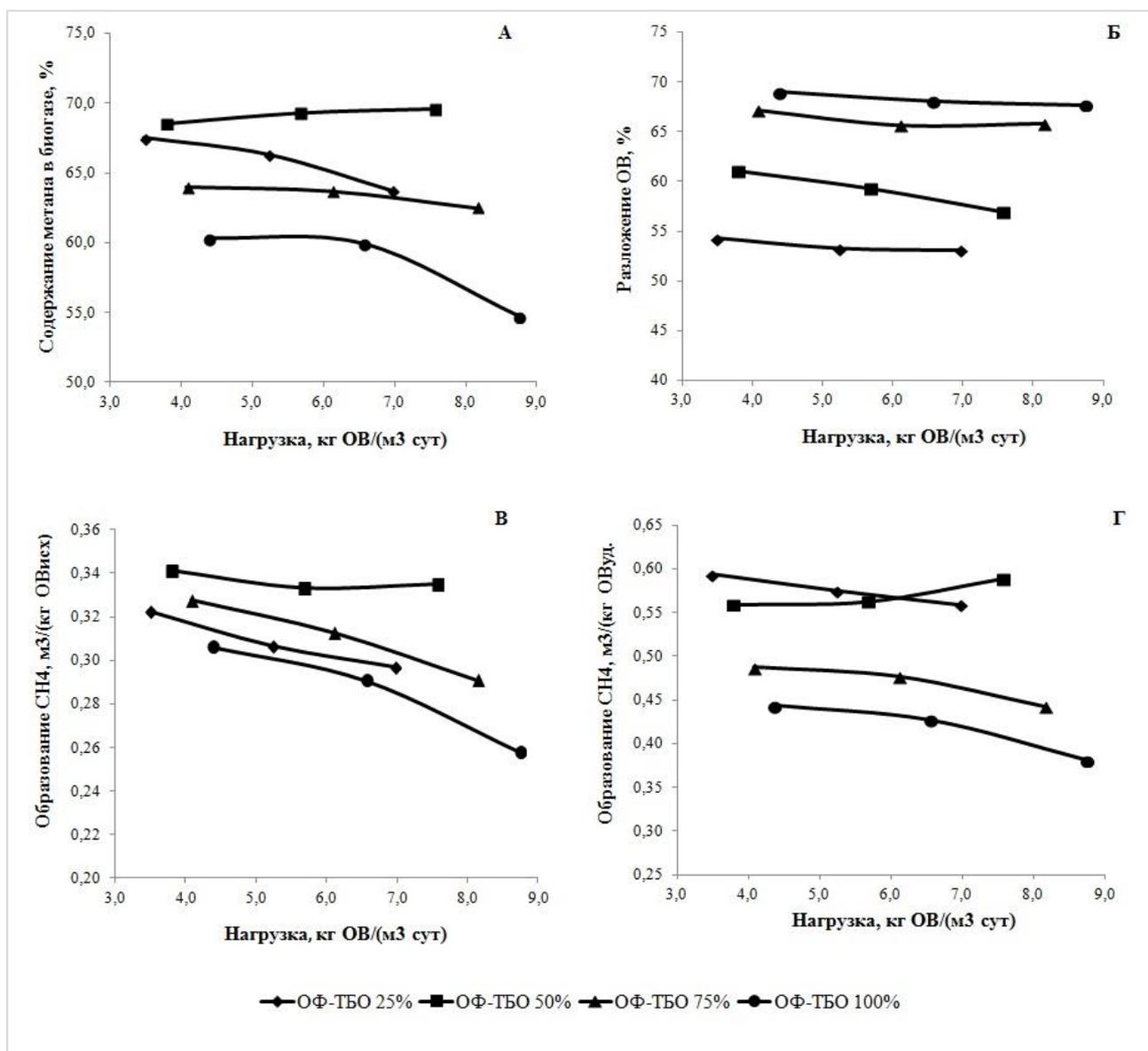


Рис. 15. Содержание метана в биогазе, % (А), степень разложения ОВ, % (Б), выход метана в расчете на ОВ исх., м³/ кг ОВ_{исх} (В) и ОВ уд. м³/ кг ОВ_{уд} (Г) в зависимости от нагрузки по органическому веществу и содержания органической фракции ТБО в субстратной смеси.

Увеличение в смеси доли ОСВ до 75% незначительно снижало содержание метана – до 63,7–67,5%. Содержание метана в биогазе снижалось до 62,5–64,0% и 54,7–60,3% при увеличении доли ОФ-ТБО до 75% и 100%, соответственно. Во всех вариантах сбраживаемых смесей, кроме ОСВ/ОФ-ТБО 50/50, наблюдали четкую закономерность: при увеличении нагрузки по ОВ и снижении влажности, содержание метана в биогазе уменьшалось. Эти

результаты согласуются с данными других авторов, полученными для жидкофазных и твердофазных анаэробных систем (Abbassi-Guendouz et al., 2012; Duan et al., 2012; Hidaka et al., 2013; Liotta et al., 2014). Одной из причин снижения содержания метана в биогазе при увеличении доли ОФ-ТБО в смеси (табл. 27), могло быть более высокое по сравнению с ОСВ содержание углеводов в ОФ-ТБО, сбраживание которых обеспечивает более низкое соотношение $\text{CH}_4:\text{CO}_2$ в биогазе – около 50:50. При этом белки и липиды, содержание которых значительно больше в уплотненном ОСВ, обеспечивают соотношение $\text{CH}_4:\text{CO}_2$ в биогазе 60:40 и 70:30, соответственно (Schnürer, Jarvis, 2010). Другой причиной могло быть изменение соотношения C/N, изменяющиеся в зависимости от соотношения субстратов в сбраживаемой смеси (Angelidaki et al., 2011; Wang et al., 2012).

Степень разложения органического вещества в зависимости от соотношения субстратов в смеси и нагрузки. Степень разложения ОВ возрастала при увеличении доли ОФ-ТБО в смеси во всех исследованных смесях (Рис. 15, Б). Наименьшая степень разложения ОВ наблюдалась при сбраживании ОСВ в качестве субстрата и составляла 50,1% ОВ. При сбраживании ОФ-ТБО и смеси, содержащей ОСВ и ОФ-ТБО в соотношении 25/75, разлагалось в среднем $68,3 \pm 0,7$ и $66,4 \pm 0,8\%$ ОВ, соответственно. При разложении смеси ОСВ и ОФ-ТБО в соотношении 50/50 степень разложения ОВ составляла $59,0 \pm 2,1\%$. Хео с соавт. зафиксировали разложение 56,8% ОВ при сбраживании смеси ОСВ и ОФ-ТБО с ГВУ 13 сут (Хео et al., 2004). Известно, что ОВ ОСВ, особенно ОВ избыточного активного ила, является более трудноразлагаемым (Arnaiz et al., 2006), поэтому его увеличение в субстратной смеси снижает степень разложения ОВ. Увеличение нагрузки в диапазоне от 3,2 до 8,7 кг ОВ/(м³ сут) приводило к небольшому снижению эффективности разложения ОВ (табл. 27, рис. 15, Б).

Выход биогаза и концентрация метана в нем. На выход биогаза и выход метана оказывали наибольшее влияние такие параметры, как нагрузка (OLR), состав сбраживаемой смеси и влажность. Выход биогаза и метана рассчитывали на исходное ОВ и на удаленное ОВ.

Выход биогаза в расчёте на исходное ОВ варьировал от 0,45 до 0,51 м³/кг ОВ_{исх} в зависимости от состава субстратной смеси. Наибольший выход биогаза для всех сбраживаемых смесей наблюдали при влажности сбраживаемой биомассы 95% (табл. 27, рис. 15, В). Минимальный выход биогаза (0,45 м³/кг ОВ_{исх}) наблюдали при сбраживании ОСВ. Максимальный выход биогаза (в среднем 0,49 м³/кг ОВ_{исх}) получили при сбраживании субстратов, содержащих более 50% ОФ-ТБО. Увеличение нагрузки по ОВ оказывало отрицательное влияние на выход биогаза и на выход метана. Наименьший выход метана – 0,26 м³ CH_4 /кг ОВ_{исх} – наблюдали при сбраживании ОФ-ТБО с максимальной нагрузкой 8,74 кг ОВ/(м³ сут) (табл. 27). Наибольший выход метана – 0,34 м³ CH_4 /кг ОВ_{исх} – наблюдали при сбраживании смеси ОСВ/ОФ-ТБО в соотношении 50/50. Полученные результаты согласуются с

данными Хео с соавт., которые показали, что при сбраживании смеси ОСВ и ОФ-ТБО с соотношением 50/50 выход метана достигает $0,32 \text{ м}^3 \text{ СН}_4/\text{кг ОВ}_{\text{исх}}$ и не снижается при двукратном увеличении нагрузки (Heo et al., 2004). Однако другие авторы при термофильном сбраживании смесей ОФ-ТБО и ОСВ в соотношении 50/50 показали выход $0,248 \text{ м}^3 \text{ СН}_4/\text{кг ОВ}_{\text{исх}}$ (Ahmadi-Pirlou et al., 2017).

При расчёте выхода биогаза на удаленное ОВ обнаружили, что увеличение доли ОФ-ТБО в смеси негативно сказывается на выходе биогаза, что, вероятнее всего, связано с изменением соотношения C/N. При сбраживании ОСВ выход биогаза в расчете на удаленное ОВ был максимальным и составлял $0,89 \text{ м}^3/\text{кг ОВ}_{\text{уд}}$. Выход биогаза снижался при увеличении доли ОФ-ТБО в смеси и составлял $0,7\text{--}0,88 \text{ м}^3/\text{кг ОВ}_{\text{уд}}$, что коррелирует с увеличением доли углеводов в смеси (табл. 27, рис. 15, Г). Увеличение нагрузки не оказывало существенного влияния на удельный выход биогаза в расчете на удаленное ОВ в смесях, содержащих ОСВ и ОФ-ТБО в соотношении 75/25 и 50/50, но неблагоприятно сказывалось на смесях, содержащих больше 50% ОФ-ТБО. Согласно данным Хабиба с соавт., при сбраживании ОСВ и ОФ-ТБО в различных соотношениях и при низкой нагрузке ($0,26\text{--}3,45 \text{ кг ОВ}/(\text{м}^3 \text{ сут})$) образовывалось $0,52\text{--}0,72 \text{ м}^3/\text{кг ОВ}_{\text{уд}}$. (Habiba et al., 2009). Однако процесс проводили в мезофильных условиях, что способствует снижению выхода метана. Более высокий выход биогаза ($0,92\text{--}1,0 \text{ м}^3/\text{кг ОВ}_{\text{уд}}$) наблюдали при ко-ферментации ОСВ с отходами супермаркетов (Dinsdale et al., 2000; Purcell, Stentiford, 2000).

Максимальный выход метана в расчете на единицу удаленного ОВ наблюдался при соотношении ОСВ/ОФ-ТБО 75/25 и 50/50 и составлял $0,56\text{--}0,59 \text{ м}^3/\text{кг ОВ}_{\text{уд}}$. Выход метана в наших экспериментах сравним с результатами, полученными в экспериментах Динсдале с соавт. (Dinsdale et al., 2000), – $0,59\text{--}0,62 \text{ м}^3/\text{кг ОВ}_{\text{уд}}$. Однако в работе Хабиба с соавт. максимальный выход метана ниже – $0,38\text{--}0,41 \text{ м}^3/\text{кг ОВ}_{\text{уд}}$, (Habiba et al., 2009). Разница объясняется различиями в составе субстратов, использованных в работах, и различными нагрузками. При увеличении доли ОФ-ТБО до 100% выход метана снижался до $0,38\text{--}0,44 \text{ м}^3/\text{кг ОВ}_{\text{уд}}$.

Таким образом, полученные результаты подтверждают положительное влияние ко-ферментации на процесс анаэробного сбраживания. Достигается баланс питательных веществ, увеличение разнообразия микроорганизмов и повышается адаптивность реактора, что позволяет увеличивать нагрузки, снижать влажность сбраживаемой смеси без потери стабильности и эффективности сбраживания. Наиболее оптимальным с точки зрения выхода метана является сбраживание смеси ОФ-ТБО и ОСВ в соотношении 50/50.

Характеристика жидкой фракции сброженной массы.

Изменение состава и влажности сбраживаемой смеси и увеличение нагрузки по ОВ оказывало существенное влияние на характеристики сброженной массы, в том числе ее жидкой фракции. Такие параметры как рН, концентрация аммонийного азота и ЛЖК, щелочность и соотношение ЛЖК/щелочность, ХПК позволяют судить о стабильности и эффективности процесса анаэробного сбраживания.

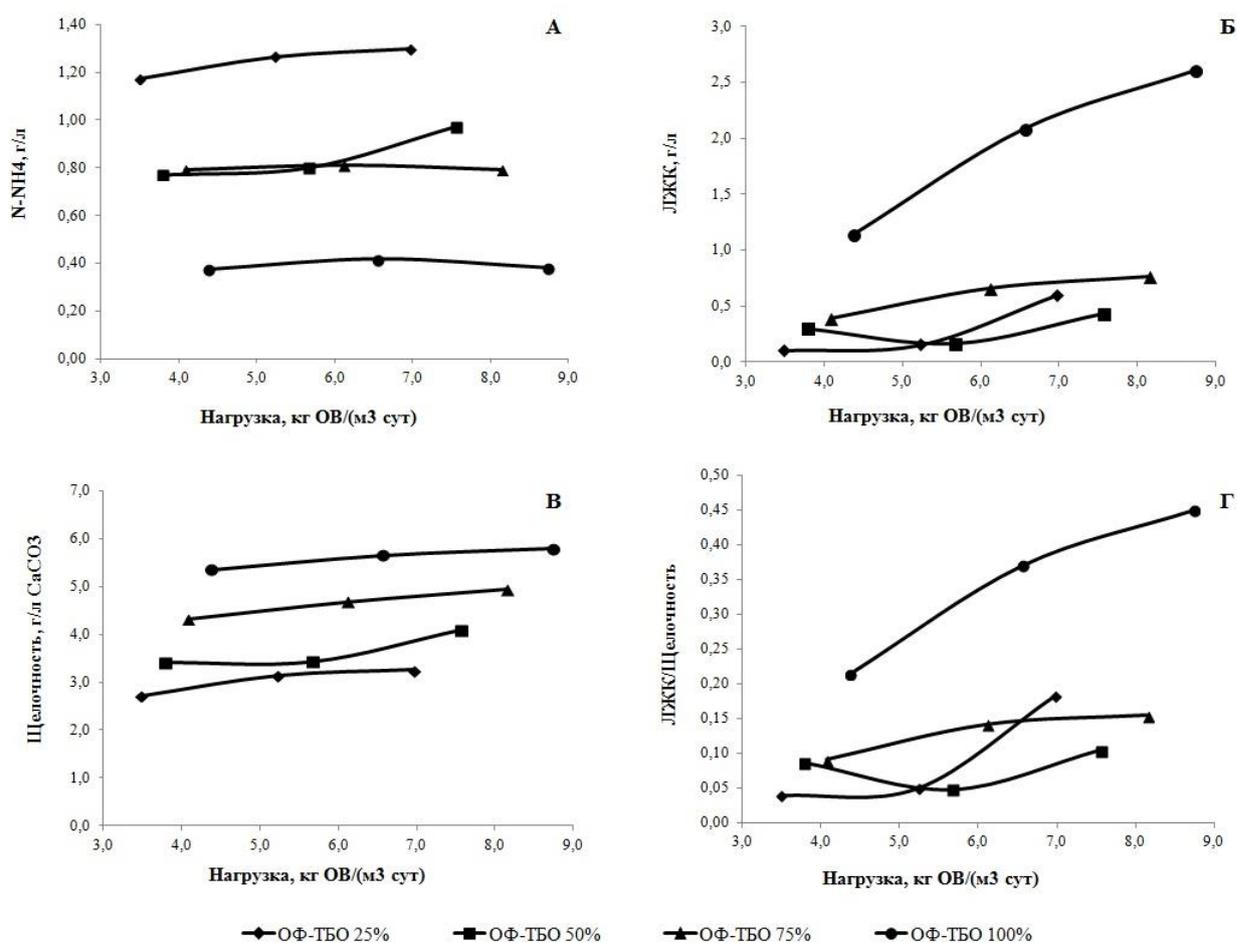


Рис. 16. Характеристика жидкой фракции сбраживаемой массы в стационарную фазу: А – концентрация аммонийного азота, г/л, Б – суммарная концентрация ЛЖК, г/л, В – щелочность, г/л CaCO₃, Г – соотношение ЛЖК и щелочности в зависимости от нагрузки по ОВ и содержания ОФ-ТБО в субстратной смеси.

Соотношение ОФ-ТБО и ОСВ существенно влияет на рН субстратной смеси, подаваемой в реактор. ОФ-ТБО характеризуется низким исходным рН, поэтому увеличение ее доли в субстратной смеси приводит к снижению исходного рН от 6,9 при сбраживании 100% ОСВ до 4,9 при сбраживании 100% ОФ-ТБО. Подобные колебания характерны при сбраживании ПО и ОФ-ТБО (Campruzano et al., 2016). При этом рН сброженной массы составлял 7,1–7,4 при

сбраживании всех вариантов субстратных смесей (табл. 27), что свидетельствовало о стабильности процесса. Тем не менее, рН не всегда является надежным индикатором, т.к. его значение сильно зависит от буферной емкости системы. В хорошо забуференной системе рН будет меняться незначительно, даже если концентрация ЛЖК станет очень высокой. Таким образом, буферная емкость может маскировать нестабильность процесса, обусловленную накоплением ЛЖК (Vjörnsson et al., 2000).

Концентрация аммонийного азота не превышала 0,97 г/л при всех исследованных соотношениях субстратов в смесях и нагрузках по ОВ за исключением варианта с соотношением ОСВ/ОФ-ТБО 75/25, где концентрация аммонийного азота $N-NH_4$ достигала 1,17–1,3 г/л (рис. 16, А). Известно, что при концентрации аммонийного азота 1,3–2,9 г/л активность метаногенеза снижается на 10% (Lay et al., 1997). Однако в экспериментах наблюдали, что при соотношении ОСВ/ОФ-ТБО 75/25 эффективность образования метана была высокой. При сбраживании смесей ОСВ и ОФ-ТБО концентрация аммония в сброженной биомассе была выше, чем при сбраживании 100% ОСВ, что совпадает с результатами других исследователей (Нео et al., 2004). Таким образом, добавление ОФ-ТБО, богатой углеводами, к ОСВ, богатым белками, способствует более эффективному разложению белков и выделению аммонийного азота за счет более сбалансированного соотношения С/Н.

Увеличение нагрузки по ОВ, снижение влажности и увеличение доли ОФ-ТБО в смеси способствовало возрастанию концентрации ЛЖК в сброженной массе, но избыточного накопления ЛЖК не происходило. На стационарной стадии концентрация ЛЖК не превышала 0,76 г/л во всех вариантах смесей, кроме 100% ОФ-ТБО, где концентрация ЛЖК возросла до 2,61 г/л при нагрузке 8,7 кг ОВ/ (m^3 сут) (табл. 28, рис 18, Б). Основной пул ЛЖК составляли ацетат и пропионат, накопления изобутирата и изовалерата не происходило (табл. 28). Отсутствие избыточного накопления ЛЖК, а также накопления ЛЖК с более длинной углеродной цепью свидетельствует о стабильности процесса сбраживания, несмотря на низкую влажность и высокую нагрузку по ОВ. Одним из факторов, способствующим поддержанию стабильности процесса при высокой нагрузке, являлась низкая интенсивность перемешивания сбраживаемой массы. Известно, что минимальное перемешивание способствует повышению стабильности при высокой нагрузке (7,6–9,4 кг ОВ/ (m^3 сут)), тогда как интенсивное перемешивание благоприятно только для низкой нагрузки (3,7 кг ОВ/ (m^3 сут)) (Stroot et al., 2001; McMahon et al., 2004; Arhoun et al., 2013). При интенсивном перемешивании и повышении нагрузки до 7,6–9,4 кг ОВ/ (m^3 сут) наблюдалось избыточное накопление ЛЖК, преимущественно ацетата (до 14 г/л) и пропионата (до 4 г/л) (Stroot et al., 2001). Минимальное перемешивание способствует инициации метаногенных центров (Vavilin, Angelidaki, 2005). Интенсивное перемешивание приводит к распределению образующихся в большом количестве

ЛЖК по всему объему сброживаемой массы, что может ингибировать синтрофных бактерий и метаногенных архей (Stroot et al., 2001; Vavilin, Angelidaki, 2005).

Таблица 28. Состав летучих жирных кислот в жидкой фракции сброженной массы в зависимости от соотношения ОФ-ТБО и ОСВ и нагрузки по органическому веществу.

ОСВ/ ОФ- ТБО	OLR, кг ОВ/ (м ³ сут)	Ацетат, мМ	Пропио- нат, мМ	Изо- бутират, мМ	Бутират, мМ	Изо- валерат, мМ	Валерат, мМ	ЛЖК _{сум} , г/л
100/0	3,19	0,491	0,058	0,010	0	0,066	0	0,04
75/25	3,49	1,657	0,069	0,004	0,032	0,004	0	0,10
	5,23	2,314	0,219	0,035	0	0,019	0	0,15
	6,97	6,939	2,427	0,195	0,163	0,319	0,021	0,59
50/50	3,78	4,639	0,188	0,056	0,004	0,087	0	0,29
	5,67	2,453	0,171	0,034	0,006	0,108	0,004	0,16
	7,56	5,871	0,860	0,106	0,264	0,108	0,016	0,43
25/75	4,08	5,404	0,956	0,112	0	0,118	0	0,39
	6,11	8,581	1,336	0,214	0,479	0,239	0,295	0,66
	8,15	8,007	3,993	0,283	0,062	0,530	0,026	0,76
0/100	4,37	12,307	5,597	0,394	0,39	0,413	0,125	1,14
	6,56	21,287	10,808	1,149	0,570	1,226	0,192	2,08
	8,74	24,629	14,842	1,784	0,691	1,816	0,307	2,61

Прим.: измеренные значения являются средними в стационарной фазе (3 ГВУ).

В наших экспериментах щелочность жидкой фракции сброженной биомассы составляла от 2,0 до 5,8 г/л CaCO₃ и возрастала с увеличением доли ОФ-ТБО в сброживаемой смеси (Рис. 16, В). Увеличение нагрузки по ОВ в меньшей степени влияло на щелочность сброженной массы. Другими авторами также показано, что типичной щелочностью при сброживании различных отходов в термофильных условиях является 2–5 г/л (Neo et al., 2003). Однако при высокой доле ОФ-ТБО в смеси с ОСВ (более 80%) возможно повышение щелочности вплоть до 8–12 г/л (Habiba et al., 2009).

Соотношение ЛЖК/щелочность используют для оценки стабильности реактора. Известно, что процесс сброживания протекает стабильно, если соотношение ЛЖК/щелочность не превышает 0,4. При увеличении соотношения до 0,8 наблюдается некоторая нестабильность,

существенная дестабилизация наблюдается при возрастании соотношения выше 0,8 (Callaghan et al., 2002). В нашей работе, соотношение ЛЖК/щелочность превышало 0,4 только при сбраживании 100% ОФ-ТБО с максимальной нагрузкой (табл. 27, Рис. 16, Г), что свидетельствовало о начале дестабилизации процесса. Это подтверждалось более низким удельным выходом биогаза и сниженным содержанием метана в биогазе (рис. 15).

Содержание в жидкой фракции сброженной массы растворенных ОВ, выраженных в ХПК (химическом потреблении кислорода) ($\text{г O}_2/\text{л}$), увеличивалось с 1,4 г/л при сбраживании только ОСВ до почти 7,51 г/л при сбраживании только ОФ-ТБО с влажностью 90%. Общей закономерностью было то, что при увеличении доли ОФ-ТБО в смеси с ОСВ и нагрузки на биореактор ХПК в жидкой фракции сброженной массы увеличивалось (табл. 27). Наибольшее увеличение ХПК наблюдалось при увеличении доли ОФ-ТБО в смеси с ОСВ с 0 до 25% и с 75 до 100%, и составляло, соответственно, 50 и 25%. При повышении доли ОФ-ТБО с 50 до 75%, ХПК жидкой фракции сброженной массы увеличивалось незначительно.

В целом следует отметить, что увеличение доли ОФ-ТБО в смеси с ОСВ выше 75% приводит к снижению эффективности и стабильности процесса.

Основные результаты и выводы по главе 4.3:

Стратегия постепенного увеличения нагрузки по субстрату являлась эффективной для запуска процесса совместного сбраживания ОСВ и ПО или ОФ-ТБО и позволила вывести реактор на рабочий режим в течение 12 сут. При использовании такой стратегии удалось добиться стабильности процесса при низкой влажности смеси (до 91,2%) и высокой нагрузке (до 8,74 кг ОВ/ (м^3 сут)). При совместном сбраживании ОСВ и ПО оптимальное соотношение субстратов в смеси составляло около 50/50 по ОВ. При времени удержания 10 сут и нагрузке 5,37 кг ОВ/ (м^3 сут) средний выход метана составлял 0,352 $\text{м}^3/(\text{кг OВ}_{\text{исх}} \text{ сут})$ с содержанием метана 65–70%. Дальнейшее увеличение доли ПО до 70% по ОВ приводило к увеличению выхода биогаза, но снижению содержания в нем метана, а также снижению влажности сбраживаемой смеси и повышению нагрузки, что увеличивает вероятность дестабилизации процесса сбраживания.

Для термофильной ко-ферментации ОСВ и ОФ-ТБО соотношение 50/50 по ОВ являлось оптимальным с точки зрения эффективности и стабильности процесса. При времени удержания 10 сут и нагрузке 7,56 кг ОВ/ (м^3 сут) скорость образования биогаза составляла 3,64 $\text{м}^3/(\text{м}^3 \text{ сут})$, содержания метана в биогазе 69%, а удельный выход биогаза и метана достигали 0,85 и 0,59 $\text{м}^3/\text{кг OВ}_{\text{уд}}$, соответственно. Использованные в работе способ подачи субстрата в реактор (одноразовая загрузка субстрата) и интенсивность перемешивания (1 мин каждые 10 мин) приводили к менее эффективному образованию метана и разложению ОВ, однако, предотвращали дестабилизацию процесса при высокой нагрузке и сниженной влажности.

5. Метаногенные консорциумы, адаптированные к высоким концентрациям летучих жирных кислот

Целью данного раздела работы являлось получение активных синтрофных метаногенных консорциумов, участвующих в сбраживании отходов, на селективных средах с использованием ацетата, пропионата и бутирата в качестве субстратов, их адаптация к повышенной нагрузке по ЛЖК, а также использование полученных консорциумов для ускорения разложения ЛЖК при сбраживании органических отходов (ОО).

5.1 Разложение бутирата при его возрастающей концентрации

Метаногенные консорциумы, адаптированные к высоким концентрациям бутирата (до 170 мМ), получали из свежего неуплотненного сброженного осадка термофильного метантенка при 50°C путем последовательного пересева биомассы (10% посевного) в свежую среду с возрастающей концентрацией субстрата: 20, 50, 95, 170 мМ бутирата. Динамика разложения бутирата, используемого в разных концентрациях, представлена на рисунке 17, параметры процессов суммированы в таблице 29.

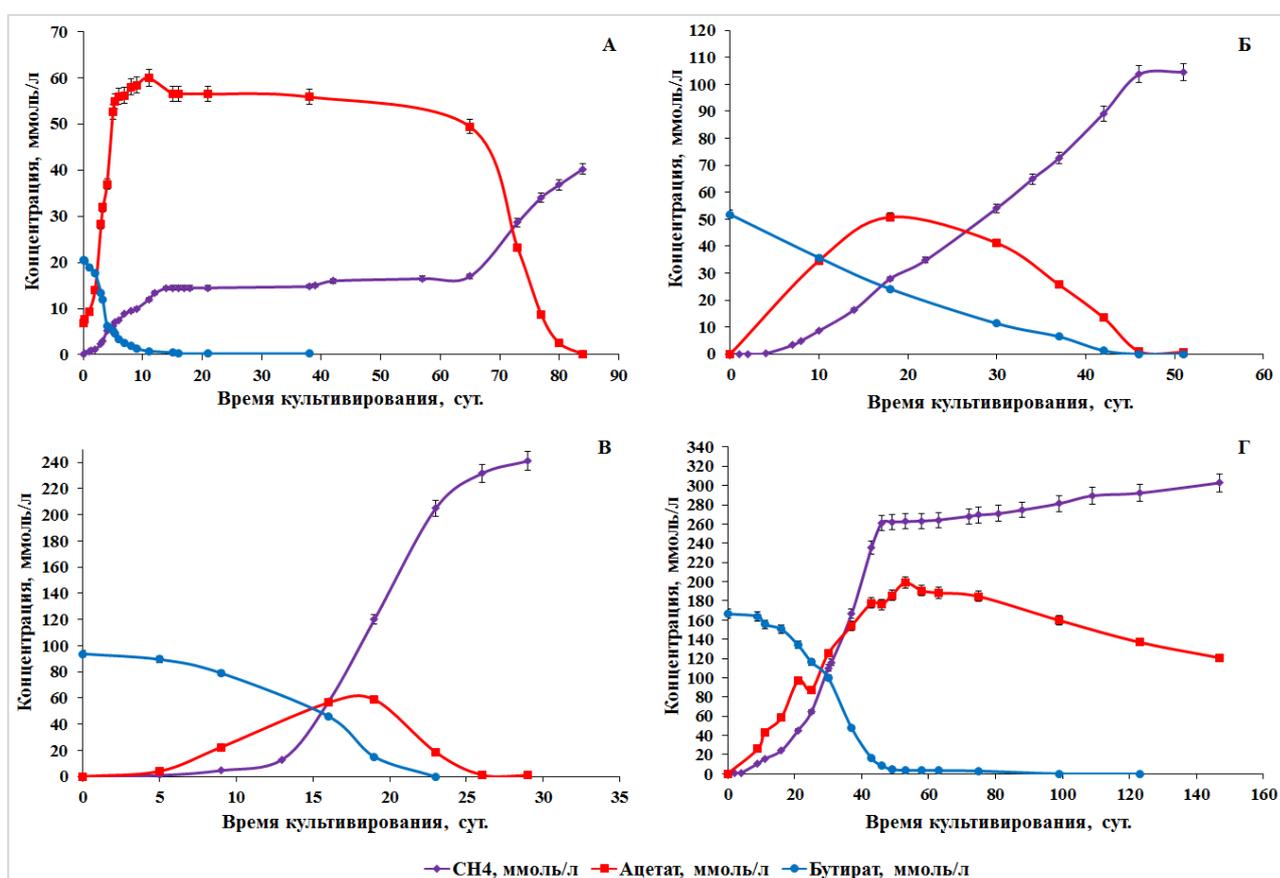


Рис. 17. Динамика разложения бутирата в зависимости от исходной концентрации субстрата в среде: А – 20 мМ, Б – 50 мМ, В – 95 мМ, Г – 170 мМ.

На начальной стадии эксперимента с исходной концентрацией субстрата 20 мМ (рис. 19, А) процесс разложения бутирата проходил в 3 последовательные стадии: 1) разложение бутирата, сопровождающееся накоплением ацетата; 2) фаза адаптации ацетат-использующих микроорганизмов к концентрации ацетата более 50 мМ; 3) утилизация ацетата. Разложение бутирата до ацетата и водорода со средней скоростью 1,3 ммоль/(л сут) происходило на первой стадии (1–16 сут). Водород детектировался в среде, начиная с 7 ч и до 7 сут культивирования, его содержание не превышало 0,04 мМ и не влияло на скорость разложения бутирата. Средняя скорость образования ацетата составляла 4,8 ммоль/(л сут), максимальная скорость накопления ацетата достигала 15,7 ммоль/(л сут) (табл. 29). В течение первых 5 сут эксперимента концентрация ацетата возросла до 53–60 мМ, что привело к ингибированию активности ацетокластических метаногенов рода *Methanothrix* spp., доминировавших в инокуляте (рис. 18, А). Образование ацетата происходило не в эквимолярных количествах: измеренная концентрация образовавшегося ацетата была 1,5 раза выше, чем теоретически рассчитанная по уравнению реакции: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{COO}^- + 2\text{H}_2\text{O} = 2\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+ + 2\text{H}_2$ (Xu et al., 2010). Избыточное образование ацетата, вероятнее всего, было связано с частичным гидролизом отмершей биомассы и разложением дрожжевого экстракта, входящего в состав среды (0,1 г/л). Образование ацетата возможно также за счет деятельности гомоацетогенных бактерий, образующих ацетат из водорода и углекислого газа: $4\text{H}_2 + 2\text{CO}_2 = \text{CH}_3\text{COOH} + 2\text{H}_2\text{O}$. Сродство гомоацетогенов к водороду ниже, чем у гидрогенотрофных метаногенов, поэтому гомоацетогены не могут эффективно конкурировать с ними и в сбалансированном метаногенном сообществе активность гомоацетогенов мала (Заварзин, 1986; Li et al., 2011). Однако при неблагоприятных условиях, например, в присутствии ингибиторов метаногенных архей или при высокой нагрузке по субстрату, гомоацетатные бактерии получают преимущества для роста (Win et al., 2016).

Таблица 29. Скорости процессов синтрофного разложения бутирата.

Скорость, ммоль / (л сут)		Исходная концентрация бутирата, мМ			
		20	50	95	170
разложения бутирата	максимальная	7,1	1,6	10,3	7,5
	средняя	1,3	1,2	4,5	3,3
образования ацетата	максимальная	15,7	3,6	3,3	7,7
	средняя	4,8	2,8	3,1	3,8
разложения ацетата	максимальная	3,65	3,1	10,1	1,03
	средняя	1,2	1,8	5,8	н.д.
образования CH_4 из бутирата	максимальная	3,3	3,6	21,2	9,4
	средняя	0,48	2,5	8,3	2,8

На второй стадии, продолжавшейся около 2 месяцев, происходила адаптация микробной популяции к концентрации ацетата более 50 мМ. Продолжительная лаг-фаза между этапом потребления бутирата и накопления ацетата и этапом преобразования ацетата в метан связана со сменой доминирующего рода ацетокластических метаногенов. В исходном инокуляте доминировали *Methanothrix*-подобные клетки. Этот род ацетокластических метаногенов является наиболее распространенным в различных биореакторах с небольшой концентрацией ацетата (Zheng, Raskin, 2000; Ma, 2006; Vavilin et al., 2008). При повышении концентрации ацетата в среде наблюдали постепенное замещение доминирующего в исходном инокуляте *Methanothrix* spp. на *Methanosarcina* spp. (рис. 18, Б). Увеличение доли представителей рода *Methanosarcina* характерно при увеличении концентрации ацетата в среде, особенно в термофильных сообществах (Ho et al., 2013). Представители рода *Methanosarcina* обладают высокой адаптивной способностью к меняющимся условиям среды, поэтому увеличение их количества способствует стабилизации сообщества (Wagner et al., 2013). При постепенном увеличении концентрации ацетата возможна адаптация метаногенного сообщества за счет накопления большой плотности *Methanothrix* spp. (Nozhevnikova et al., 2007) и специфической агрегации (Ma et al., 2006). Однако в нашем случае происходило быстрое (5 сут) накопление ацетата в концентрации более 50 мМ, что оказалось неблагоприятным для метаногенов рода *Methanothrix* и вызвало субстратное ингибирование.

После накопления достаточного количества *Methanosarcina*-подобных ацетокластических метаногенов, которое наблюдалось при микроскопическом исследовании, произошло преобразование ацетата в метан.

После полного потребления ацетата консорциум был пересейан в среду с исходной концентрацией бутирата 50 мМ (рис. 17, Б). Скорости разложения бутирата и накопления ацетата были ниже, чем в первом эксперименте (табл. 29), однако процессы разложения бутирата и образования метана были более сбалансированы. Наличие в биомассе активных гидрогенотрофных и *Methanosarcina*-подобных ацетокластических метаногенов позволило избежать накопления высоких концентраций ацетата и остановки метаногенеза (рис. 18, В, Г). В первые 20 сут эксперимента при разложении 30,2 мМ бутирата происходило накопление 50,8 мМ ацетата в среде, что ниже максимального теоретически рассчитанного значения на 16%. Это указывало на одновременное прохождение процессов синтрофного разложения бутирата и гидрогенотрофного и ацетокластического метаногенеза. Водород в газовой фазе детектировался в первые сутки культивирования в концентрации 0,3 мМ и ближе к концу опыта (30–37 сут) – 2,24 мМ. Существенного влияния на активность синтрофных бактерий не наблюдалось.

Наиболее эффективно разложение бутирата происходило при пересеве на среду с исходной концентрацией субстрата 95 мМ (рис. 17, В), что указывало на адаптацию микробного

сообщества к условиям культивирования (рис. 18, Д). Показано, что бутират в концентрации до 100 мМ не оказывал ингибирующего действия на микроорганизмы метаногенного сообщества. Лаг-фаза составляла около 5 сут. Разложение бутирата происходило с максимальной скоростью 10,3 ммоль/(л сут) и завершилось в течение 23 сут (табл. 29, рис. 17, В). Водород в среде детектировался на 3 сут культивирования в концентрации до 0,5 мМ и потреблялся в течение суток. Максимальная концентрация ацетата в среде составляла 58,8 мМ (около 47% от максимального теоретически рассчитанного значения).

Стадия разложения ацетата вновь стала лимитирующей при последующем увеличении исходной концентрации бутирата до 170 мМ (рис. 17, Г). Разложение бутирата началось после короткой лаг-фазы (3–4 сут) и проходило со средней скоростью 3,3 ммоль/(л сут). К 50 сут эксперимента концентрация бутирата в среде составляла менее 5 мМ. Максимальная скорость образования метана составляла 7,5 ммоль/(л сут) и была ниже, чем при разложении бутирата в концентрации 95 мМ (10,3 ммоль/(л сут)), на 27% (табл. 29). Полученные результаты согласуются с данными Догана с соавт., которые установили, что добавление 220, 170 и 48 мМ ацетата, бутирата и пропионата, соответственно, приводит к снижению продукции метана в 2 раза (Dogan et al., 2005).

Максимальная концентрация ацетата в среде составляла 198,8 мМ (60% от теоретического значения). Разложение ацетата и образование метана после исчерпания бутирата резко замедлились: в течение последующих 95 сут концентрация ацетата снизилась лишь на 78 мМ (40%). Поскольку накопления водорода в газовой фазе не происходило, а рН среды поддерживался на уровне 7,5–8,0, то высокая концентрация ацетата является наиболее вероятным фактором, оказывающим негативное влияние на микробное сообщество. Доказано, что ингибирующий эффект ацетата сильнее, чем таковой у бутирата (Wang et al., 2009; Amani et al., 2011).

Литературные данные об ингибирующих концентрациях ацетата варьируют. Доган с соавт. показали, что активность ацетокластических метаногенов снижается уже при концентрации ацетата 68 мМ (Dogan et al., 2005). Иллмер с соавт. установили, что концентрация ацетата 150 мМ приводит к дестабилизации работы термофильного крупномасштабного реактора, сбрасывающего ОСВ и ОФ-ТБО (Illmer, Gstraunthaler, 2009). По данным Линс с соавт. ингибирующие концентрации ацетата варьируют от 23 до 81 мМ (Lins et al., 2010). Ножевникова с соавт. показали, что концентрация ацетата (5–100 мМ) влияет на скорость термофильного метаногенеза: чем ниже концентрация ацетата, тем выше скорость образования метана (Nozhevnikova et al., 2007). В наших экспериментах наблюдали ингибирование процесса метаногенеза при концентрации ацетата выше 50 мМ при первом пересеве. Однако уже при следующем пересеве отмечали адаптацию сообщества к такой концентрации.

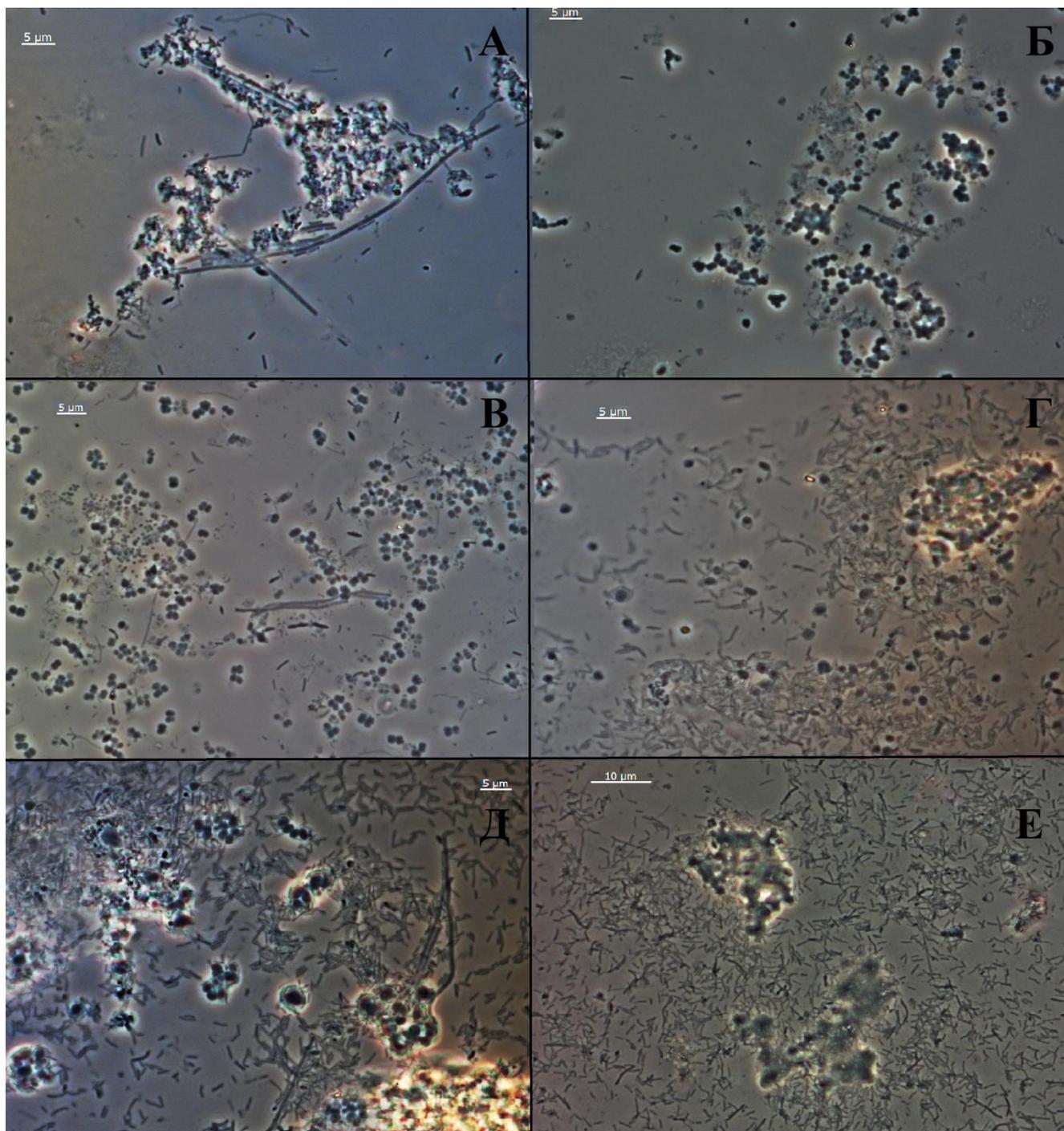


Рис. 18. Морфология клеток в метаногенных консорциумах с бутиратом в качестве субстрата: А – исходная концентрация бутирата 20 мМ, начало эксперимента; Б - исходная концентрация бутирата 20 мМ, конец эксперимента; В, Г – исходная концентрация бутирата 50 мМ, середина и окончание эксперимента; Д – исходная концентрация бутирата 95 мМ, конец эксперимента; Е – исходная концентрация бутирата 170 мМ, стадия накопления ацетата. Фазовый контраст. Маркер масштаба – 5-10 мкм.

При накоплении около 200 мМ ацетата в среде наблюдали стойкое ингибирование процесса преобразования ацетата в метан. При адаптации анаэробного сообщества к высоким концентрациям ацетата в среде, при концентрации выше 120 мМ максимальная скорость роста

мезофильных микроорганизмов была на 40% выше, чем термофильных, тогда как при более низкой концентрации ацетата скорость роста термофилов была выше или равна скорости роста мезофилов (Fotidis et al., 2013). При повышении температуры проницаемость клеток возрастает, и высокие концентрации субстратов оказывают на них более выраженное ингибирующее действие (Vavilin et al., 2008).

Примечательно, что при накоплении высоких концентраций ацетата в среде, происходило повышение значений pH с 6,5–7,0 до 7,5–8,0. Причиной этого может быть гидролиз отмершей биомассы с последующим выделением аммония в среду, а также образование CO_2 и его растворение в среде, которое формирует бикарбонатную щелочность (Ножевникова и др., 2016).

В ходе эксперимента наблюдали образование небольшого количества пропионата в среде (до 1 мМ), что может также являться свидетельством разбалансировки сообщества, а именно недостаточной активности H_2 -использующих и ацетокластических метаногенов (Xu et al., 2010).

Таким образом, при синтрофном разложении бутирата стадией, лимитирующей метаногенез, являлась стадия разложения промежуточного продукта – ацетата, для осуществления которой необходимо присутствие в сообществе плотной популяции активных ацетат-использующих микроорганизмов с высокими скоростями роста. Концентрация бутирата до 170 мМ не оказывала существенного негативного влияния на синтрофных бактерий и метаногенных архей.

5.2 Разложение пропионата при возрастающей концентрации при температуре 50 и 55°C

Получение синтрофных консорциумов, адаптированных к повышенной концентрации пропионата, проводили по той же схеме, что и с бутират-разлагающими консорциумами. Динамика разложения пропионата метаногенными консорциумами из сброженного осадка представлена на рисунке 19, параметры процесса суммированы в таблице 30.

Разложение пропионата при его начальной концентрации 23 мМ началось без фазы задержки, и он полностью потребился за 21 сут. Максимальная скорость разложения пропионата составляла 2,0 ммоль/(л*сут) (табл. 30). Параллельно с разложением пропионата происходило накопление в среде ацетата, при этом, как и на первом этапе эксперимента с бутиратом (20 мМ), измеренная концентрация образовавшегося ацетата была в 1,5 раза выше, чем теоретически рассчитанная. Наиболее вероятной причиной более высокой концентрации ацетата в среде являлось образование ацетата при разложении отмершей биомассы или из дрожжевого экстракта, входящего в состав среды.

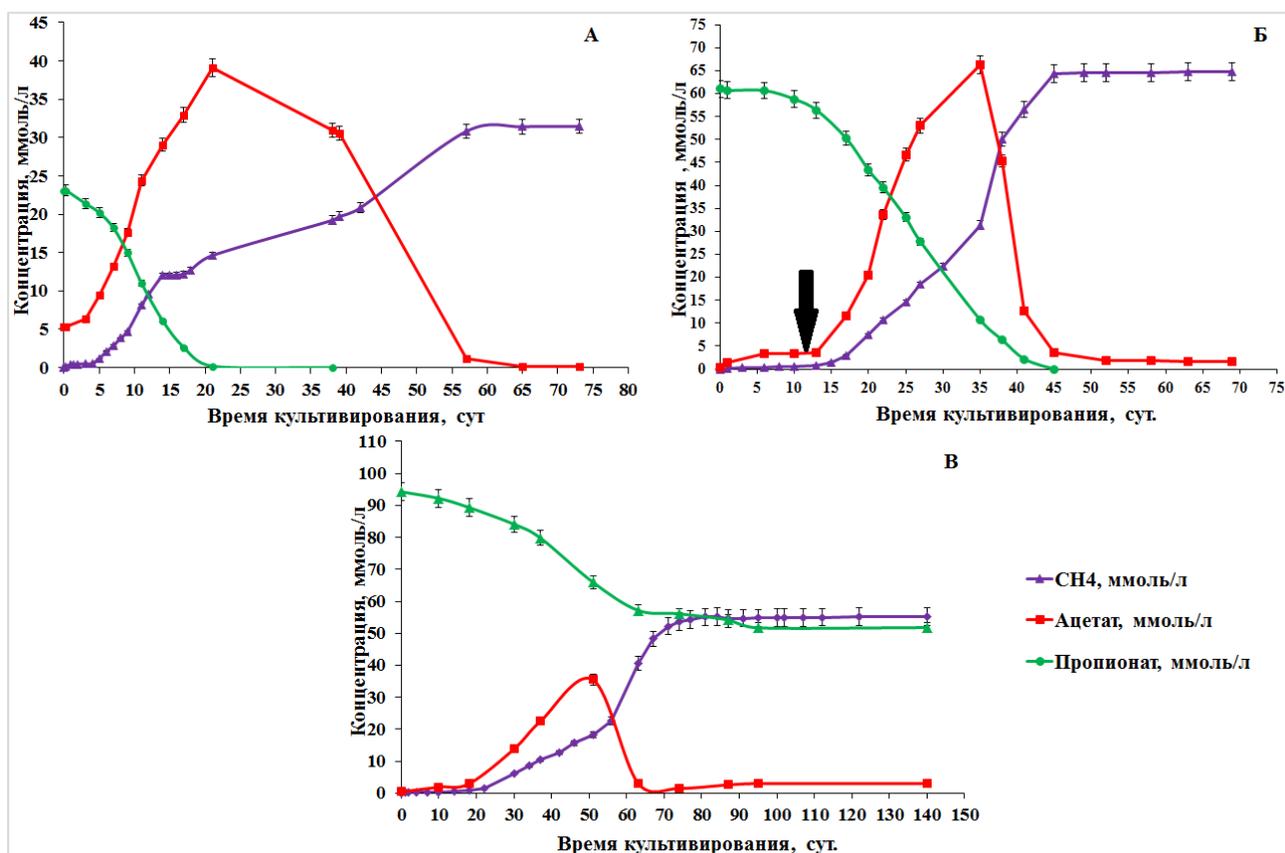


Рис. 19. Динамика разложения пропионата в зависимости от исходной концентрации пропионата в среде и температуры: А – 23 мМ, температура 50°С, Б – концентрация 60 мМ, температура 50–55°С, В – концентрация 95 мМ, температура 55°С. Стрелкой обозначен момент смены температуры с 50°С на 55°С.

Процесс образования метана протекал с лаг-фазой (4–5 сут). Процесс не был лимитирован активностью синтрофных пропионат-разлагающих бактерий или водород-использующих метаногенов, т.к. пропионат активно разлагался, при этом образующийся водород сразу же потреблялся метаногенами. Разложение пропионата сопровождалось изменением значения рН среды в пределах 7,0–7,5 и повышением до 8,0 в конце эксперимента. Изменение рН, вероятнее всего, было связано с исчерпанием ЛЖК из среды и накоплением CO_2 , подщелачивающего среду (Ножевникова и др., 2016). Водород детектировался в следовых количествах, начиная с 7 ч до 9 сут инкубации, максимальная его концентрация в газовой фазе – 0,026 мМ – наблюдалась на 3 сут.

Процесс разложения пропионата проходил в две стадии: 1) разложение пропионата, сопровождавшееся накоплением ацетата; 2) преобразование ацетата в метан, которое активно начиналось после полного исчерпания пропионата из среды. После увеличения концентрации ацетата в среде более 30 мМ, наблюдалась фаза задержки метаногенеза (3 сут), при этом пропионат продолжал потребляться, а ацетат накапливаться.

Таблица 30. Скорости процессов синтрофного разложения пропионата.

Скорость, ммоль/(л сут)		Исходная концентрация пропионата, мМ		
		23	60	95
разложения пропионата	максимальная	2,0	2,2	0,99
	средняя	1,1	1,4	0,6
образования ацетата	максимальная	3,3	6,6	1,2
	средняя	1,9	1,2	0,7
разложения ацетата	максимальная	1,6	10,9	2,7
	средняя	0,9	3,8	2,0
образования CH ₄ из пропионата	максимальная	1,7	6,2	2,6
	средняя	0,5	1,2	0,7

Процесс накопления ацетата при разложении пропионата проходил более медленно по сравнению с разложением бутирата – в течение 20 сут образовалось 30 мМ ацетата, максимальная скорость образования ацетата составляла 3,3 ммоль/(л сут). Максимальная концентрация ацетата в среде не превышала 40 мМ. Данные факторы способствовали постепенной адаптации популяции ацетокластических метаногенов, что позволило избежать длительной фазы задержки ацетокластического метаногенеза. В результате микроскопии пропионат-разлагающих консорциумов на стадии накопления ацетата, выявлено большое количество микроорганизмов, морфологически сходных с представителями рода *Methanothrix* (рис. 20, Б). Таким образом, стратегия адаптации термофильного метаногенного сообщества к постепенному повышению концентрации ацетата в среде при концентрациях до 40 мМ заключалась в увеличении плотности ацетокластических метаногенов с высоким сродством к субстрату, родственных представителям рода *Methanothrix*. Полученные результаты подтверждают данные предыдущих исследований (Nozhevnikova et al., 2007). При дальнейших пересевах в среду с более высокими концентрациями пропионата (60 и 95 мМ) численность клеток, схожих с *Methanothrix* spp., постепенно снижалась (рис. 20, В–Е).

Динамика разложения пропионата в наших экспериментах схожа с результатами, полученными Стамсом и соавт. при культивировании накопительной культуры, полученной из сброженного осадка термофильного лабораторного биореактора, обогащенной чистыми культурами гидрогенотрофных и ацетокластических метаногенов, с пропионатом в качестве единственного субстрата (20 мМ) при 55°C (Stams et al., 1992). Единственным существенным отличием было, что концентрация ацетата в смеси не превышала 12 мМ (в нашем эксперименте – более 35 мМ), что свидетельствовало о высокой активности ацетокластических метаногенов в эксперименте Стамса и соавт. (Stams et al., 1992).

После полного исчерпания пропионата и ацетата, консорциум был пересейан в среду с концентрацией пропионата 60 мМ. После пересева наблюдали длительную лаг-фазу: в течение 14 сут около 5 мМ пропионата разложилось с образованием менее 4 мМ ацетата и около 1 мМ метана (рис. 19, Б).

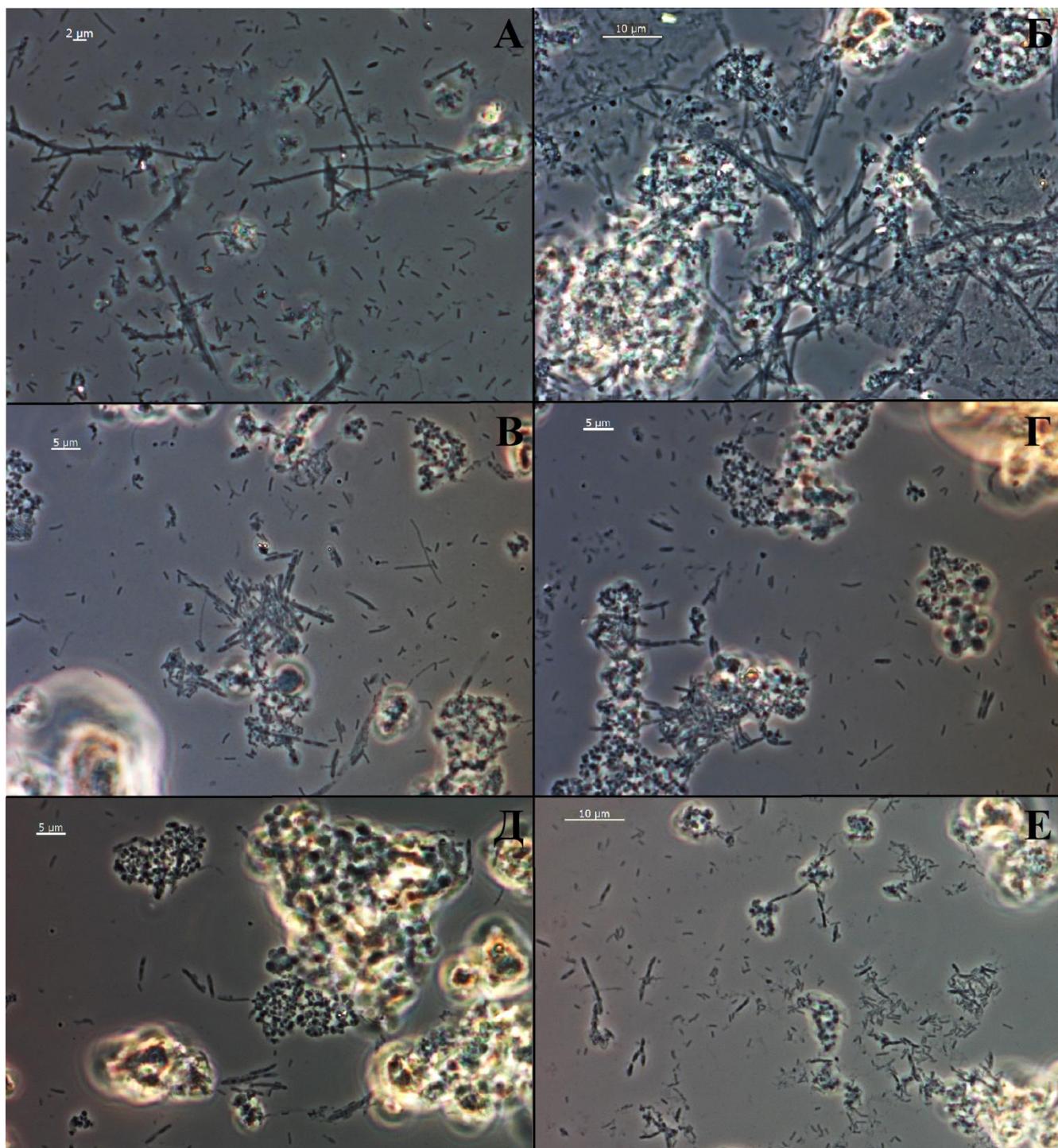


Рис. 20. Морфология клеток в метаногенных консорциумах с пропионатом в качестве субстрата: А – исходная концентрация пропионата 23 мМ, стадия накопления ацетата, 50°С; Б – исходная концентрация пропионата 23 мМ, накопление *Methanotherix*-подобных клеток к концу эксперимента, 50°С; В, Г – исходная концентрация пропионата 60 мМ, стадия разложения ацетата, 55°С; Д - исходная концентрация пропионата 95 мМ, стадия разложения пропионата, 55°С; Е - исходная концентрация пропионата 95 мМ, окончание эксперимента, 55°С. Маркер масштаба соответствует 2-10 мкм.

Водород детектировали в газовой фазе в следовых количествах в течение первых 24 ч инкубации, значение рН среды сохранялось на уровне 7,0. Высокая концентрация пропионата привела к ингибированию активности синтрофных бактерий. При концентрации пропионата 38 мМ не наблюдали изменений активности синтрофных бактерий (Pullammanappallil et al., 2001). Доган и соавт. показали, что при концентрации пропионата 48 мМ активность ацетогенов снижается вдвое (Dogan et al., 2005).

С целью стимулирования процесса разложения пропионата на 15 сут эксперимента температура инкубации была увеличена с 50 до 55°C. Температура 55°C более благоприятна для пропионат-окисляющих микроорганизмов (Stams et al., 1992; Imachi et al., 2002). Увеличение температуры инкубации до 55°C способствовало увеличению скорости процессов, особенно образования ацетата и гидрогенотрофного метаногенеза. Разложение пропионата при температуре 55°C происходило в течение 30 сут. Максимальную концентрацию ацетата (66 мМ) наблюдали через 20 сут после повышения температуры. Потребление ацетата проходило с максимальной скоростью 10,9 ммоль/(л сут) до момента полного исчерпания пропионата из среды. До 35 сут эксперимента образующийся метан имел преимущественно гидрогенотрофное происхождение, а затем – смешанное – гидрогенотрофное и ацетокастическое.

При последующем увеличении концентрации пропионата до 95 мМ и инкубации при 55°C было показано существенное ингибирующее воздействие субстрата на синтрофный процесс (рис. 19, В). После длительной лаг-фазы разложение пропионата протекало наиболее интенсивно с 35 по 60 сут эксперимента с максимальной скоростью 0,99 ммоль/(л*сут), что вдвое медленнее, чем в предыдущих экспериментах. К 60 сут эксперимента около 39% пропионата было использовано синтрофными бактериями, однако затем разложение пропионата полностью прекратилось. Концентрация ацетата при этом не превышала 35 мМ и, соответственно, не могла быть фактором, вызывающим дестабилизацию процесса. Концентрация водорода в газовой фазе к 60 сут была ниже определяемых величин, что указывало на отсутствие ингибирования синтрофных бактерий водородом. Значение рН среды во время разложения пропионата изменялось в пределах 6,0–7,5, однако после 60 сут инкубации началось постепенное защелачивание среды до рН 9,0–9,5. Повышение рН в термофильных условиях наблюдается чаще, чем в мезофильных, и связано с более активным выделением аммонийного азота в среду, а также накоплением CO₂, что способствовало подщелачиванию (Zamanzadeh et al., 2013; Ножевникова и др., 2016). Источником аммонийного азота может служить отмершая биомасса (Ножевникова и др., 2016). Уровень рН около 8,0 при инициации процесса анаэробного разложения ОВ не является благоприятным и приводит к длительной фазе задержки. Например, в экспериментах Жай и соавт. лаг-фаза составляла более 30 сут (Zhai

et al., 2015). Увеличение рН до 9,0 и выше приводит к остановке метаногенеза (Ножевникова и др., 2016).

Таким образом, концентрация пропионата 60 мМ и более в среде лимитирует активность микроорганизмов метаногенного сообщества, в первую очередь, синтрофных бактерий. Температура инкубации 55°C более благоприятна для разложения пропионата, чем температура 50°C. Повышение рН до 9,0–9,5 при концентрации пропионата 95 мМ привело к ингибированию процесса разложения пропионата. Повышение рН, вероятнее всего, связано с растворением CO₂ и накоплением аммония, выделившегося при гидролизе отмершей биомассы.

5.3 Разложение смесей ЛЖК при температуре 50 и 55°C

Получение консорциумов, адаптированных к высоким концентрациям смеси ЛЖК, составляющих основной пул ЛЖК при разложении органических субстратов, – ацетата, пропионата и бутирата, проводили при температуре 50 и 55°C (С–50 и С–55, соответственно). В предыдущем эксперименте было показано, что температура 55°C более благоприятна для пропионат-окисляющих синтрофных бактерий. Динамика разложения смесей ЛЖК при 50 и 55°C представлена на рисунке 21, параметры процесса суммированы в таблице 31.

Таблица 31. Параметры процесса синтрофного разложения смесей ЛЖК при 50 и 55°C

Параметр		Единицы измерения	Смесь 1 – 50°C (С-50)	Смесь 2 – 55°C (С-55)
Исходная концентрация ацетата: пропионата: бутирата		ммоль/л	40: 30: 30	60: 25: 30
Лаг-фаза разложения ацетата		сут	9	0
Лаг-фаза разложения пропионата		сут	17	30
Лаг-фаза разложения бутирата		сут	0	1
Скорость разложения ацетата	макс.	ммоль/(л сут)	4,9	3,8
	средняя		2,3	2,1
Скорость разложения пропионата	макс	ммоль/(л сут)	0,5	2,7
	средняя		0,3	0,6
Скорость разложения бутирата	макс	ммоль/(л сут)	5,2	2,9
	средняя		1,7	1,05
Общая скорость образования CH ₄ из ЛЖК		макс.	9,8	5,6

При разложении смеси ЛЖК при 50°C отмечали наличие фаз задержки в использовании ацетата (9 сут) и пропионата (17 сут), при этом разложение бутирата начиналось без лаг-фазы. Разложение бутирата проходило со средней скоростью 1,7 ммоль/(л сут) (табл. 31). Разложение ацетата, внесенного в качестве субстрата и образующегося при разложении бутирата, происходило параллельно.

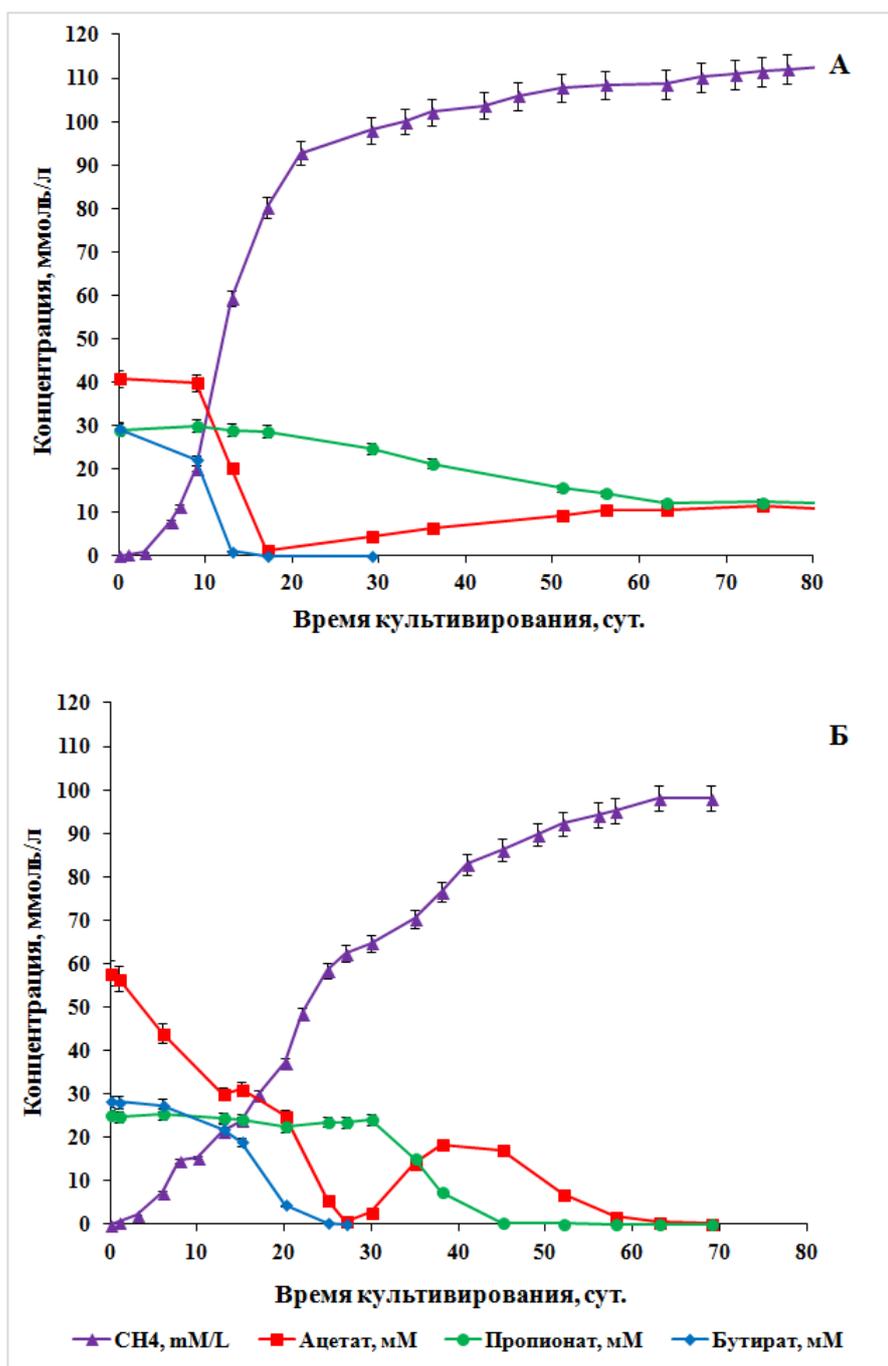


Рис. 21. Динамика разложения смесей ЛЖК при 50 и 55 °С: А – смесь ацетата (40 мМ), пропионата (30 мМ) и бутирата (30 мМ), 50°С; Б – смесь ацетата (60 мМ), пропионата (25 мМ) и бутирата (30 мМ), 55°С.

На 17 сут эксперимента бутират был полностью исчерпан, концентрация ацетата не превышала 1,2 мМ. Разложение пропионата при 50°С происходило с 20 по 65 сут эксперимента. Было использовано около 59% пропионата, однако полной утилизации пропионата не было достигнуто даже к 140 сут эксперимента. Наблюдалось накопление ацетата, образующегося при синтрофном разложении пропионата, что свидетельствовало об ингибировании активности ацетат-использующих микроорганизмов, активность которых не восстановилась вплоть до

окончания эксперимента. Причиной остановки метаногенеза, как и в случае с накопительными культурами, полученными при концентрации пропионата 95 мМ, стало увеличение рН до 9,0–9,2.

Фаза задержки при разложении пропионата в смеси при 55°C (С–55) составляла 30 сут, при этом бутират и ацетат начинали использоваться без лаг-фазы. Увеличение фазы задержки при разложении пропионата, вероятнее всего, связано с более высокой концентрацией ацетата в смеси С–55 (60 мМ) по сравнению со смесью С–50 (40 мМ).

Согласно данным Ван Лиера и соавт., внесение 50 мМ ацетата в реактор, субстратом для которого являлся пропионат (35 мМ), привело к существенному ингибированию процесса разложения пропионата (Van Lier et al., 1993). Несмотря на фазу задержки, пропионат в С–55 разложился полностью в течение 15 сут с максимальной скоростью 2,7 ммоль/(л сут). Образовавшийся ацетат был полностью использован в течение следующих 17 сут. Накопления водорода или повышения рН не происходило, что свидетельствовало о более сбалансированном течении процесса при 55°C. Максимальная скорость образования метана была выше в С–50, однако средняя скорость метаногенеза была выше в С–55 (табл. 31).

Независимо от температуры инкубации процесс разложения смесей ЛЖК проходил в две последовательные стадии: 1) стадия разложения ацетата и бутирата, 2) стадия разложения пропионата, которая начиналась после полного исчерпания ацетата и бутирата в среде. Таким образом, разложение пропионата является стадией, лимитирующей общую скорость разложения ЛЖК. Полученные данные соответствуют результатам предыдущих исследований (Wang et al., 2009; Lins et al., 2010; Fotidis et al., 2013). Предпочтительное использование бутирата над пропионатом показано ранее при разложении смесей ЛЖК микробными сообществами из различных природных и антропогенных мест обитания при низких температурах (3–15°C) (Nozhevnikova et al., 2000). Известно о более медленном метаболизме пропионата в сравнении с другими ЛЖК в большинстве анаэробных реакторов, а также о том, что его накопление свидетельствует о нестабильности процесса (Wang et al., 2009; Lins et al., 2010).

Поддержание температуры, наиболее благоприятной для пропионат-окисляющих синтрофов, активность которых лимитирует общую скорость разложения ЛЖК, чрезвычайно важно для сохранения стабильности процесса. В наших экспериментах при 55°C процесс протекал стабильно. В схожем эксперименте в мезофильных (35°C) условиях при концентрациях ацетата, пропионата и бутирата, равных 70, 40 и 40 мМ, соответственно, наблюдалась полная дестабилизация процесса (Wang et al., 2009).

Основные результаты и выводы по главам 5.1 – 5.3:

1) При синтрофном разложении бутирата до метана стадией, лимитирующей общую скорость метаногенеза, являлась стадия разложения промежуточного продукта – ацетата, для осуществления которой необходимо присутствие в сообществе плотной популяции активных ацетокластических метаногенов с высокими скоростями роста.

2) Увеличение концентрации пропионата в сбраживаемой смеси более 30 мМ может привести к дестабилизации процесса в связи с ингибированием активности синтрофных бактерий.

3) Температура 55°C является более благоприятной для активности пропионат-разлагающих бактерий и способствует полному разложению пропионата.

4) Разложение пропионата начинается только после использования ацетата и бутирата в среде.

5.4. Проверка активности метаногенных консорциумов, адаптированных к высокой концентрации летучих жирных кислот

Активность полученных метаногенных консорциумов, адаптированных к высокой нагрузке по ЛЖК, проверяли в эксперименте по сбраживанию ОФ-ТБО при различных исходных соотношениях инокулята к субстрату (И/С). Добавление изучаемых консорциумов способствовало существенному повышению эффективности процесса анаэробного сбраживания. В экспериментальных смесях с соотношением И/С 50/50 процесс развивался стабильно со средней скоростью $0,232 \pm 0,005$ ммоль CH_4 /(г $\text{O}_{\text{всх}}$ сут) (табл. 32).

В контрольных образцах (контроль 1, И/С 50/50) средняя скорость образования метана не превышала $0,067 \pm 0,001$ ммоль CH_4 /(г $\text{O}_{\text{всх}}$ сут), что в 3,5 раза меньше, чем в образцах с добавлением консорциума. В экспериментальных смесях с соотношением И/С 20/80 наблюдалось наличие лаг-фазы продолжительностью 3–5 сут, однако затем процесс стабилизировался и развивался со средней скоростью $0,228 \pm 0,005$ ммоль CH_4 /(г $\text{O}_{\text{всх}}$ сут). В контрольных образцах (контроль 2, И/С 20/80) на 3–5 сут инкубации процесс полностью дестабилизировался, поэтому рассчитать среднюю скорость невозможно. Максимальное количество ЛЖК накапливалось во всех образцах на 2–3 сут и в сумме достигало 6,8–7,1 г/л. При этом в смесях с добавлением консорциумов накапливалось в 1,5–2 раза больше ЛЖК, чем в контрольных. Это связано с возможностью более глубокого разложения субстрата микроорганизмами адаптированных консорциумов, а также отсутствием ингибирования промежуточными продуктами, которые быстро использовались соответствующими группами микробного сообщества. ЛЖК во всех экспериментальных смесях и контрольных образцах с соотношением И/С 50/50 были полностью утилизированы к концу эксперимента. В

контрольных образцах с соотношением И/С 50/50 содержание водорода в газовой фазе не превышало 0,71 мМ, а в экспериментальных смесях 0,15 мМ. Во всех контрольных образцах с И/С 20/80 наблюдали высокое содержание водорода от 15,86 мМ в начале эксперимента до 12,14 мМ в конце. Такое высокое содержание водорода свидетельствовало о дисбалансе процесса.

Таблица 32. Характеристика процесса анаэробного сбраживания с использованием адаптированных метаногенных консорциумов.

Варианты экспериментальных смесей	Разложение ОВ, %	Выход метана за 30 сут, ммоль СН ₄ /г ОВ исх.	Средняя скорость метаногенеза, ммоль СН ₄ /(г ОВ исх. сут)	Максимальная скорость метаногенеза, ммоль СН ₄ /(г ОВ исх. сут)
Смесь 1 (И/С 50/50 по ОВ) с консорциумом	34,6±1,7	7,97±0,39	0,232±0,005	1,094±0,020
Контроль 1 (И/С 50/50 по ОВ) с водой	12,0±0,6	1,28±0,06	0,067±0,001	0,366±0,007
Смесь 2 (И/С 20/80 по ОВ) с консорциумом	38,1±1,8	7,77±0,39	0,228±0,005	1,239±0,024
Контроль 2 (И/С 20/80 по ОВ) с водой	5,2±0,3	0,19±0,01	—*	0,091±0,002

*— невозможно рассчитать среднюю скорость, т.к. на 3–5 сут эксперимента процесс дестабилизировался и выход метана был минимальный.

Таким образом, полученные адаптированные консорциумы проявили высокую активность, как в благоприятных для сбраживания условиях, так и в условиях, вызывающих дестабилизацию процесса сбраживания, вызванную избыточным накоплением ЛЖК. При этом выход метана и средняя скорость метаногенеза были близки при сбраживании обоих вариантов смесей. А максимальная суточная скорость образования метана в образцах со сниженным количеством инокулята была выше, чем при благоприятном соотношении И/С.

Схожий эксперимент был проведен Агани с соавт., которые применяли адаптированный консорциум для интенсификации метаногенеза при высокой нагрузке по ЛЖК в качестве субстрата (Amani et al., 2011). Использование консорциума позволило снизить время удержания без потери стабильности процесса. В ходе эксперимента было установлено, что одним из ключевых аспектов, определяющих скорость метаногенеза и стабильность процесса, является соотношение количества активных метаногенов и ацетогенов (Amani et al., 2011). Эти данные подкрепляют наши выводы о важности поддержания высокой плотности ацетат-

продуцирующих и ацетат-использующих микроорганизмов для повышения эффективности процесса сбраживания.

Разнообразие синтрофных связей имеет критичное значение для стабильности анаэробного процесса. Присутствие водород – использующих спутников повышает эффективность ферментирующих и ацетогенных бактерий. Показано, что скорость роста и скорость разложения пептидов культурой *Coprothermobacter* увеличивается в 4 раза при росте в ко-культуре с *Methanothermobacter* spp. (Sasaki et al., 2011). Синтрофные взаимодействия способствуют увеличению выхода биогаза, так как позволяют более глубоко использовать субстраты обрабатываемых отходов (Gagliano et al., 2015). Использование адаптированных консорциумов перспективно потому, что их воздействие на метаногенное сообщество, находящееся в состоянии дестабилизации, вызванной избыточным накоплением ЛЖК, связано в первую очередь не с изменением плотности микроорганизмов, а с коренным изменением физиологических связей между ними (Wang et al., 2009; Lins et al., 2014).

5.5. Определение состава бутират-разлагающего консорциума в эксперименте с исходной концентрацией бутирата 170 мМ

Образцы биомассы для молекулярно-биологического анализа (клонирование гена 16S рНК) были отобраны через 20 сут после начала инкубации (начальная стадия разложения бутирата с исходной концентрацией 170 мМ) и через 120 сут (стадия разложения ацетата). Филогенетические дендрограммы, построенные на основании анализа последовательностей гена 16S рНК бактерий и архей, наиболее представленных в консорциуме, устойчивом к высокой концентрации бутирата (170 мМ), представлены на рис. 22 и 23. В табл. 33 представлены данные о доле клонированных последовательностей, принадлежащих тем или иным микроорганизмам, и степени их сходства с известными видами.

Бактериальное сообщество в начальной стадии эксперимента было более разнообразно, чем в конце (табл. 33, рис. 22). В начале эксперимента в бактериальном сообществе детектировались микроорганизмы, филогенетически родственные *Syntrophomonas wolfei* subsp. *saponavida* DSM 4212 (94,7% сходства последовательности гена 16S рНК), способные синтрофно разлагать бутират. Около 30% клонированных последовательностей принадлежало бактериям, родственными представителям вида *Syntrophaceticus schinkii* Sp3 (96,4% сходства), для которых показана способность к синтрофному окислению ацетата. В качестве минорного компонента выявлены последовательности, принадлежащие микроорганизмам, родственными другим известным 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%.

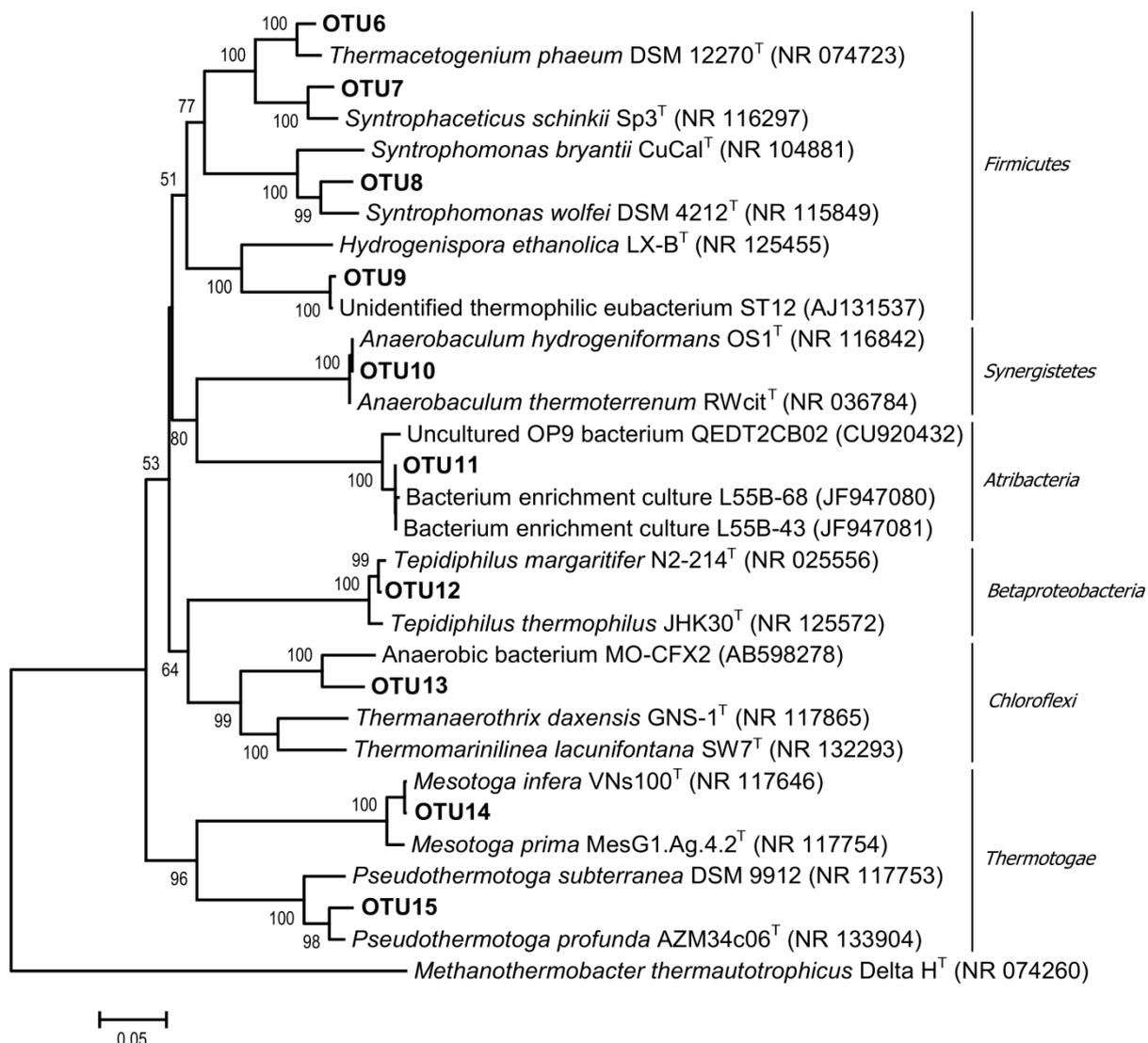


Рис. 22. Филогенетическая дендрограмма, построенная на основании анализа данных секвенирования последовательностей 16S рРНК гена наиболее представленных бактериальных групп консорциума, устойчивого к высокой концентрации бутирата.

Около 38% последовательностей принадлежало *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*, класс *Anaerolineae*, которые традиционно являются одной из наиболее многочисленных групп микроорганизмов, обитающих в анаэробных биореакторах, и часто бывают включены в синтрофные анаэробные консорциумы (Jang et al., 2014).

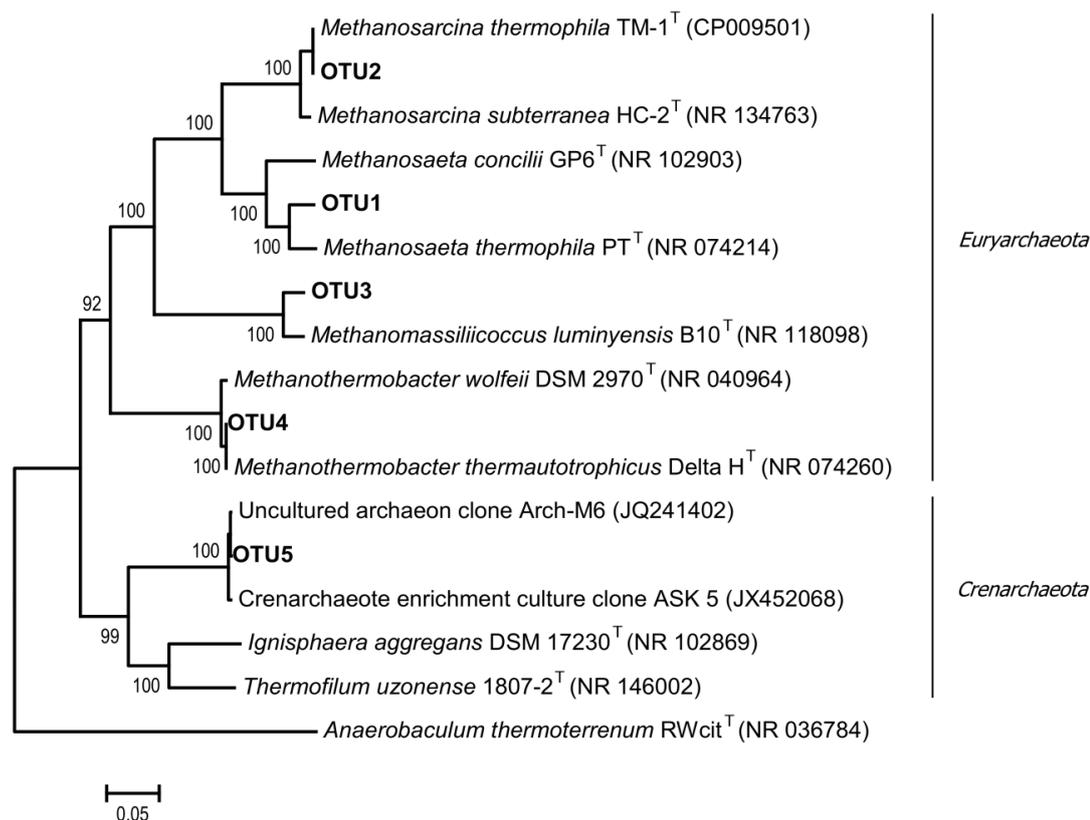


Рис. 23. Филогенетическая дендрограмма, построенная на основании анализа данных секвенирования последовательностей 16S рНК гена наиболее представленных архей консорциума, устойчивого к высокой концентрации бутирата

Доминирующим видом метаногенных архей на начальных этапах эксперимента была *Methanosarcina thermophila* TM-1 (100% сходства) – 86% клонированных последовательностей (табл. 33, рис. 23). В качестве минорной группы ацетокластических метаногенов детектировались микроорганизмы, родственные *Methanothermobacter thermophila* PT (95,8%) – 4,3% последовательностей. Представители рода *Methanothermobacter* чувствительны к высокой концентрации ацетата в среде (Welte, Deppenmeier, 2014). Однако, судя по полученным данным, эти метаногены способны переживать высокие концентрации ацетата до 60 мМ за счет агрегации, формирования защитного внешнего матрикса и существования внутри микробных гранул. Подобный механизм описан у мезофильного метаногена *Methanothermobacter* (*Methanosaeta*) *harundinacea*, способного переживать концентрации ацетата ≥ 100 мМ (Ma et al., 2006). Гидрогенотрофные метаногены были представлены *Methanothermobacter thermautotrophicus* Delta H (100% сходства) – 3,2% последовательностей. В сообществе также обнаружены микроорганизмы, родственные *Methanomassiliicoccus luminyensis* B10 (95,7%), облигатно зависимым от водорода метилотрофным метаногенам.

Таблица 33. Представленность бактерий и архей в бутират-разлагающем метаногенном консорциуме в начале и в конце эксперимента.

Филогенетическая группа	№ OTU	Доля последовательностей, %		Наиболее близкие виды на основании последовательности гена 16S рPHK	
		Начало эксперимента (20 сут)	Конец эксперимента (120 сут)	Название наиболее близкого вида	Сходство последовательности, %
Метаногенные археи					
<i>Methanosaeta</i>	OTU1	4,3	0,0	<i>Methanosaeta thermophila</i> PT	95,8
<i>Methanosarcina</i>	OTU2	86,0	25,0	<i>Methanosarcina thermophila</i> TM-1	100,0
<i>Methanomassiliicoccus</i>	OTU3	3,2	21,9	<i>Methanomassiliicoccus luminyensis</i> B10	95,7
<i>Methanothermobacter</i>	OTU4	3,2	53,1	<i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i> Delta H	100,0
Бактерии					
<i>Thermacetogenium</i>	OTU6	5,1	7,1	<i>Thermacetogenium phaeum</i> DSM 12270	97,1
<i>Syntrophaceticus</i>	OTU7	30,4	42,9	<i>Syntrophaceticus schinkii</i> Sp3	96,4
<i>Syntrophomonas</i>	OTU8	2,5	0,0	<i>Syntrophomonas wolfei</i> DSM 4212	94,7
<i>Firmicutes</i>	OTU9	2,5	26,2	<i>Hydrogenispora ethanolica</i> LX-B	87,6
<i>Anaerobaculum</i>	OTU10	38,0	14,3	<i>Anaerobaculum hydrogeniformans</i> OS1	100,0
<i>Tepidiphilus</i>	OTU12	2,5	0,0	<i>Tepidiphilus margaritifer</i> N2-214	99,4
<i>Anaerolineae</i>	OTU13	15,3	7,1	<i>Thermanaerotherix daxensis</i> GNS-1	96,0
<i>Mesotoga</i>	OTU14	1,3	0,0	<i>Mesotoga infera</i> VNs100	99,9
<i>Pseudothermotoga</i>	OTU15	1,3	0,0	<i>Pseudothermotoga profunda</i> AZM34c06	97,4

К концу эксперимента произошла смена состава сообщества (табл. 33). 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 принадлежали представителям группы неклассифицированных *Firmicutes*, среди которых распространены синтрофные бактерии. Представленность бактерий, родственных *A. hydrogeniformans* и *Chloroflexi*, снизилась и составляла 14,3 и 7,1% 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 при накоплении высоких концентраций ацетата в среде. Данные микроскопии и молекулярно-биологического анализа позволяют представить, каким образом происходила смена доминирующих микробных групп в сообществе и типа метаногенеза.

При разложении пропионата и бутирата наблюдали различные стратегии адаптации микробного сообщества к повышению концентрации ацетата в среде. При разложении пропионата накопление ацетата происходило медленнее, поэтому адаптация происходила в первую очередь за счет увеличения плотности ацетокластических метаногенов, родственных *Methanothrix* spp. (рис. 20, Б). При дальнейшем увеличении концентрации ацетата и пропионата в среде происходило постепенное накопление ацетокластических метаногенов рода *Methanosarcina* (рис. 20, В, Г). При разложении бутирата накопление ацетата происходило резко, что приводило к ингибированию активности представителей рода *Methanothrix* и длительной лаг-фазе, необходимой для увеличения плотности метаносарцин (рис. 18, А, Б). Хо и соавт. показали, что увеличение численности представителей рода *Methanosarcina* является универсальной стратегией адаптации к увеличивающейся концентрации ацетата в термофильных сообществах (Ho et al., 2013). Полного элиминирования представителей рода *Methanothrix* не происходило даже при концентрации ацетата около 100 мМ. Вероятнее всего, при таких высоких концентрациях *Methanothrix* sp. сохраняет жизнеспособность внутри микробных агрегатов (Ma et al., 2006).

При увеличении исходной концентрации бутирата до 100 мМ и более и концентрации ацетата до 100 мМ в исследуемом сообществе доминировали метаногены рода *Methanosarcina*, осуществляющие ацетокластический метаногенез. Дальнейшее увеличение концентрации ацетата в среде приводило к смене основного пути образования метана с ацетокластического на

гидрогенотрофный. К моменту полного разложения бутирата (исходная концентрация 170 мМ) и накопления высоких концентраций ацетата (≥ 200 мМ) при микроскопии отмечали увеличение количества палочковидных микроорганизмов и их агрегатов. Данные молекулярно-биологического анализа свидетельствуют о том, что доля *Methanosarcina* в сообществе снижалась, и доминирующими группой метаногенных архей становились водород-использующие *Methanothermobacter*. Похожие изменения в популяции метаногенных архей отмечали Джанг с соавт.: при повышении нагрузки доля представителей *Methanosarcinales* снижалась с 81,3 до 54%, а доля представителей *Methanobacteriales* и *Methanomicrobiales* увеличивалась с 5 до 17% и с 11 до 25%, соответственно (Jang et al., 2014). Схожие результаты получили Хао с соавт., которые, используя изотопные методы, показали, что в реакторе при исходной концентрации ацетата ≥ 100 мМ до 89% образующегося метана продуцируется гидрогенотрофными метаногенами, использующими водород, образующийся в результате синтрофного разложения ацетата. При снижении концентрации ацетата до 65 мМ доля метана, образующегося таким путем, снижалась до 60%, при дальнейшем снижении концентрации ацетата доля метана, образующегося за счет активности ацетикластических метаногенов, возрастала до 60% и более (Hao et al., 2011).

Снижение плотности *Methanosarcina* spp. было ранее показано в условиях ацидификации, что связано с их большей чувствительностью к колебаниям pH. Гидрогенотрофные метаногены более устойчивы к снижению pH, которое наблюдается при избыточном накоплении ацетата в среде (Wang et al., 2009; Akuzawa et al., 2011; Fotidis et al., 2013). Однако в наших экспериментах снижения pH даже при максимальных концентрациях ацетата в среде не происходило, соответственно, этот фактор не был определяющим при смене состава сообщества.

Показано, что именно изменения состава бактериальной популяции при повышении нагрузки приводили к смене основного типа метаногенеза с ацетокластического на гидрогенотрофный (Jang et al., 2014). При увеличении концентрации ацетата в среде доминирующей группой бактерий становились микроорганизмы, родственные синтрофным ацетат-окисляющим бактериям: *S. schinkii*, *P. lettingae*, *T. phaeum*, *T. acetatoxydans*. Среди представленных видов *S. schinkii* является мезофильным, остальные виды представлены термофильными бактериями (Westerholm et al., 2010). При клонировании отмечали увеличение числа клонов неклассифицированных представителей *Firmicutes*. Все описанные к настоящему времени синтрофные ацетат-окисляющие бактерии относятся к отделу *Firmicutes* классу *Clostridia* (Westerholm et al., 2010), весьма вероятно, что в сообществе могли присутствовать новые виды бактерий, способных к синтрофному анаэробному использованию ацетата.

На основании полученных результатов можно утверждать, что при разложении высоких концентраций ацетата (≥ 100 мМ) одновременно происходили процессы ацетокластического метаногенеза и гидрогенотрофного метаногенеза, сопряженного с синтрофным разложением ацетата. При увеличении концентрации ацетата в термофильных условиях роль синтрофного пути его трансформации существенно возрастает (Westerholm et al., 2017). Выводы подтверждаются данными Сасаки и соавт., которые с помощью меченого ацетата установили, что при термофильном сбраживании ОФ-ТБО около 80% ацетата превращается в метан через синтрофное окисление ацетата с последующим гидрогенотрофным метаногенезом и только около 20% – через ацетокластический метаногенез (Sasaki et al., 2011).

Полученные результаты противоречат заключению Хаттори о том, что термофильные условия и низкая концентрация ацетата (менее 1 мМ) являются наиболее подходящими для ацетат-утилизирующих синтрофных бактерий, и именно в этих условиях они преобладают над ацетокластическими метаногенами (Hattori, 2008). Полученные результаты не согласуются также с данными Фотидис с соавт. и Хао с соавт., которые показали, что при повышении концентрации ацетата в среде в термофильных условиях происходит смена пути метаногенеза с пути гидрогенотрофного, сопряженного с синтрофным окислением ацетата, на ацетокластический путь образования метана (Hao et al., 2011; Fotidis et al., 2013).

Не совсем ясно, почему в сообществе детектируются миксотрофные метаногены, родственные представителям порядка *Methanomassiliicoccales*, и количество последовательностей, принадлежащих родственным микроорганизмам, возрастает в конце эксперимента, а также какую функцию они выполняют в синтрофном сообществе. Эта уникальная группа метаногенов включает метилотрофных метаногенных архей, растущих только на метаноле и/или метиламинах и не способных окислять эти субстраты до CO_2 , что приводит к облигатной зависимости данного типа метаногенеза от молекулярного водорода (Iino et al., 2013; Lang et al., 2015). Порядок *Methanomassiliicoccales* на сегодняшний момент состоит из единственного культивируемого вида – *Methanomassiliicoccus luminyensis*, выделенного из фекалий человека (Dridi, 2012), и нескольких незаконных видов, являющихся высокообогащенными накопительными культурами (Iino, 2013; Lang, 2015). Стоит отметить, что метанол периодически детектировали в среде на разных стадиях эксперимента в следовых концентрациях. Однако за динамикой его накопления и потребления не следили, не считая это необходимым до получения данных молекулярного анализа. Также нам не известно в результате какого процесса метанол мог образовываться в среде, где исходным и единственным субстратом являлся бутират.

Основные результаты и выводы по главе 5.5:

Процесс адаптации исследуемого нами сообщества к изменяющейся концентрации ацетата на первых этапах процесса был связан с накоплением ацетокластических метаногенов: представителей рода *Methanotherix* при постепенном увеличении концентрации ацетата (при разложении пропионата) или представителей рода *Methanosarcina* при резком увеличении концентрации ацетата (при разложении бутирата). Дальнейшие преобразования связаны с появлением большого количества агрегированных структур, включающих палочковидные формы, окруженные сарциноподобными клетками. При увеличении концентрации ацетата выше 100 мМ количество палочковидных бактерий существенно увеличивалось, а доля сарциноподобных агрегатов снижалась. Происходила смена ключевого пути метаногенеза с ацетокластического на гидрогенотрофный, сопряженный с синтрофным окислением ацетата.

6 Выделение и описание новой синтрофной бактерии '*Thermocaenobacter saccharolyticus*' gen. nov., sp. nov. штамм SP2

Консорциум, адаптированный к высокой концентрации бутирата (170 мМ), был использован для выделения чистых культур метаногенных архей и синтрофных бактерий. При выделении в чистую культуру гидрогенотрофного метаногена *Methanothermobacter thermoautotrophicus* на плотной агаризованной среде с газовой смесью H_2/CO_2 в качестве субстрата были получены колонии двух морфотипов. Темно-серые колонии, имеющие гладкую линзовидную форму, принадлежали метаногену, пушистые сероватые колонии образовывались грамположительной бактерией. Морфологически схожие сероватые колонии формировались на плотной среде с кротонатом натрия в качестве субстрата. Колонии были пересеяны в свежую жидкую среду для дальнейшей очистки и описания. В результате была выделена чистая культура бактерии, получившая рабочее название штамм SP2.

Морфология штамма SP2.

Клетки штамма SP2 представляют собой палочки длиной от 2 до 10 мкм, диаметром около 0,5 мкм. Клетки одиночные, в парах, иногда в коротких цепочках (рис. 24). Морфология клеток меняется в зависимости от условий среды и фазы роста от более тонких и длинных палочек до более коротких и толстых палочек. Клетки подвижны за счет одного или нескольких латеральных жгутиков (рис. 25). Клетки окрашиваются по Грамму положительно. Клеточная стенка грамположительного типа. Образуют терминальные споры.

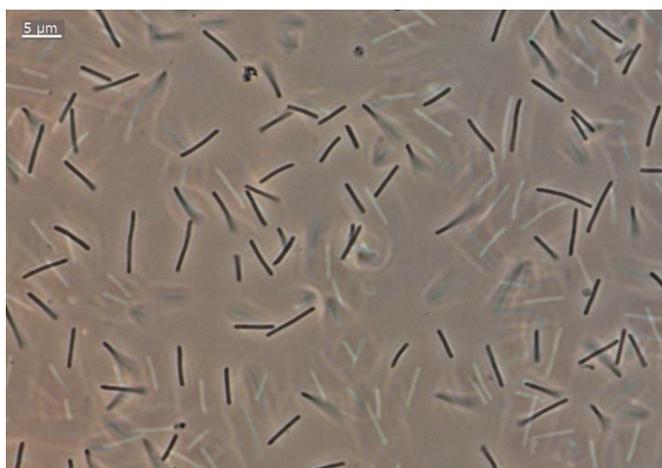


Рис. 24. Морфология клеток штамма SP2. Фазово-контрастная микроскопия (AxioImager DI, CarlZeiss, Германия). Маркер масштаба – 5 мкм.

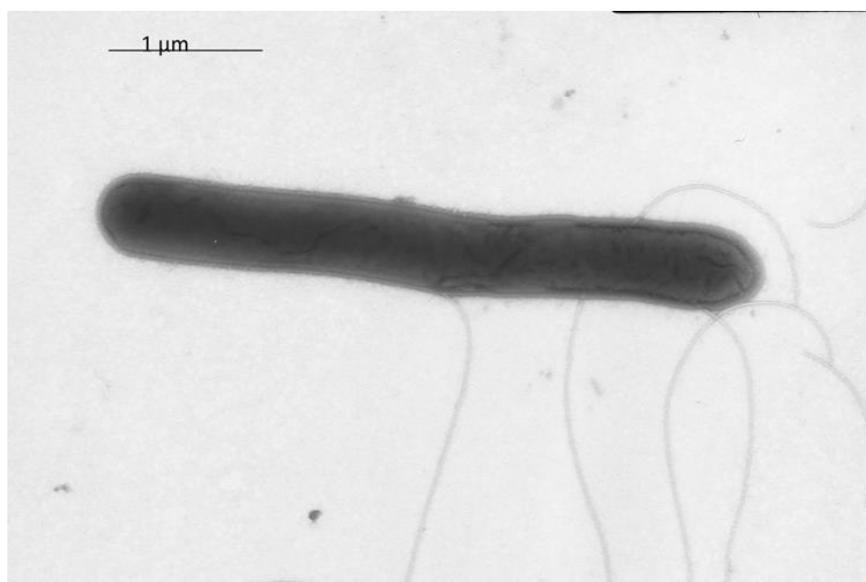


Рис. 25. Микрофотография клеток штамма SP2, на которой видны жгутики. Просвечивающая электронная микроскопия (JEOL 100C XII, Япония). Маркер масштаба – 1 мкм.

Физиология штамма SP2.

Физиологию штамм SP2 изучали с использованием среды Пфеннига с сахарозой в качестве субстрата. Рост исследовали в интервале температур от 15 до 80°C, диапазоне pH от 3,5 до 10,0, концентрации NaCl от 0 до 4%, при содержании кислорода в газовой фазе 0,5%, 5% и 10%. Выделенная бактерия 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, с оптимумом при 7,5. Рост не наблюдался при температуре ниже 20 и выше 70°C и pH ниже 3,5 и выше 8,0 в течение 30 сут. Штамм SP2 не является галофилом, т.к. максимальная скорость роста наблюдалась в отсутствие NaCl, рост наблюдался в диапазоне концентраций NaCl от 0 до 2,5%. Данные представлены на рисунке 26.

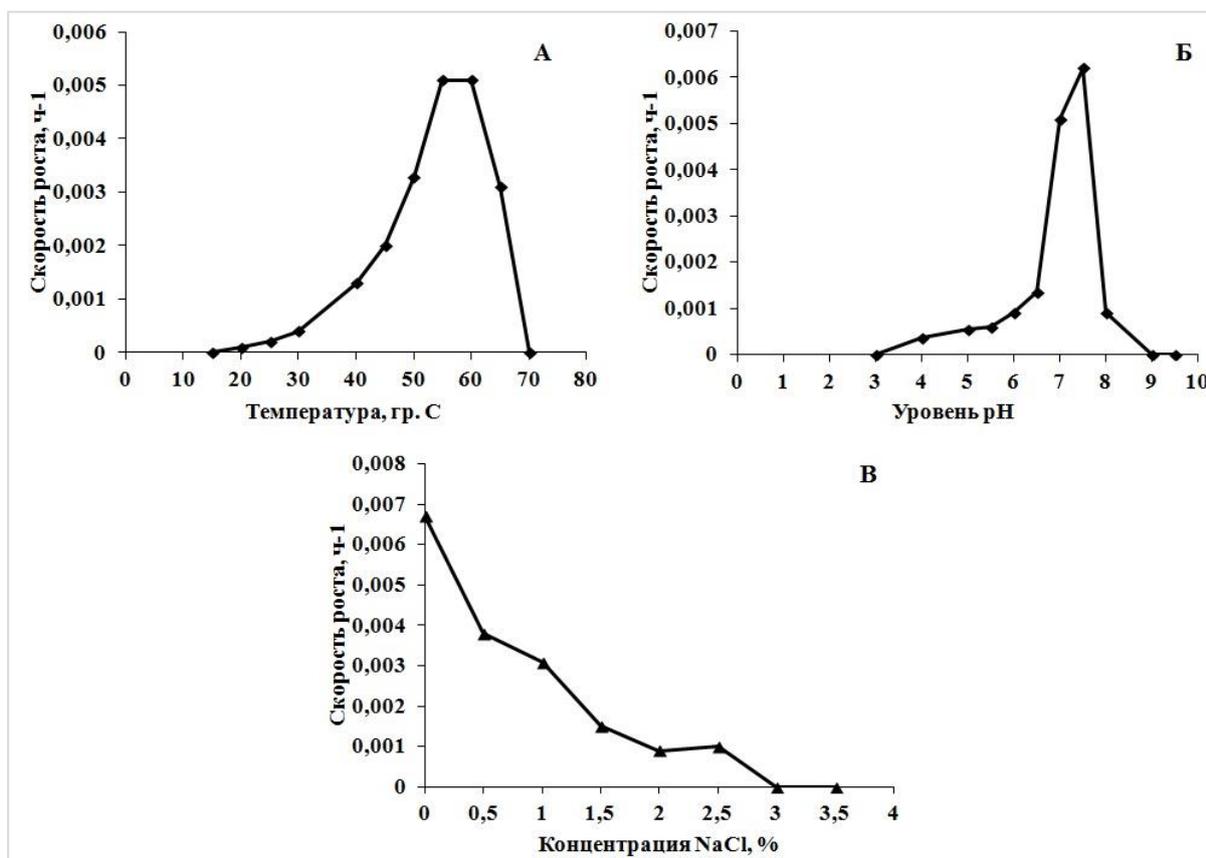


Рис. 26. Определение диапазона и оптимальных условий роста штамма SP2: А – температура роста, Б – уровень pH, В – соленость среды.

В чистой культуре штамм SP2 использовал следующие субстраты: целлобиозу, фруктозу, маннозу, галактозу, дрожжевой экстракт, сахарозу и глюкозу. При этом дрожжевой экстракт являлся не только субстратом, но и источником факторов роста. Слабый рост (10^6 клеток/мл и менее) наблюдался на ксилане, рамнозе, цистеине, казामीновых кислотах. Рост штамма SP2 отсутствовал на сорбате, целлюлозе, ксилане, бутирате, ацетате, пропионате, малате, метаноле, этаноле, пептоне, раффинозе, рибозе, лактозе, арабинозе, лактате, мелибиозе, крахмале, глюкозамине, пирувате, формиате, глицерине, кротонате, бетаине.

Продуктами сбраживания глюкозы являлись ацетат, этанол, H_2 и CO_2 , что свидетельствует о том, что штамм SP2 является хемоорганогетеротрофом со смешанным типом брожения.

Выделенная бактерия в качестве акцептора электронов использует тиосульфат (с образованием H_2S) и не использует сульфит, сульфат, дитионит и коллоидную серу. При выращивании с тиосульфатом и коллоидной серой внутри клеток бактерий образовывались глобулы элементарной серы (рис. 27, 28). Для подтверждения того, что агрегаты внутри клеток не являются спорами, провели окраску по методу Циля и электронную микроскопию (рис. 28). Известно, что некоторые бактерии рода *Thermoanaerobacter* (например, *T. sulfurignens*, *T.*

yonseiensis) при выращивании с тиосульфатом способны к накоплению глобул серы как внутри клеток, так и снаружи (Kozianowski et al., 1997; Kim et al., 2001; Lee et al., 2007). При этом накопление глобул серы внутри клеток начинается в экспоненциальной фазе роста, а активное образование и выделение глобул в среду происходит в стационарную фазу (Lee et al., 2007). При росте штамма SP2 наблюдалась схожая тенденция, при этом клетки, внутри которых образовались глобулы серы, теряли подвижность. Механизм реакции образования глобул серы внутри клеток не известен.

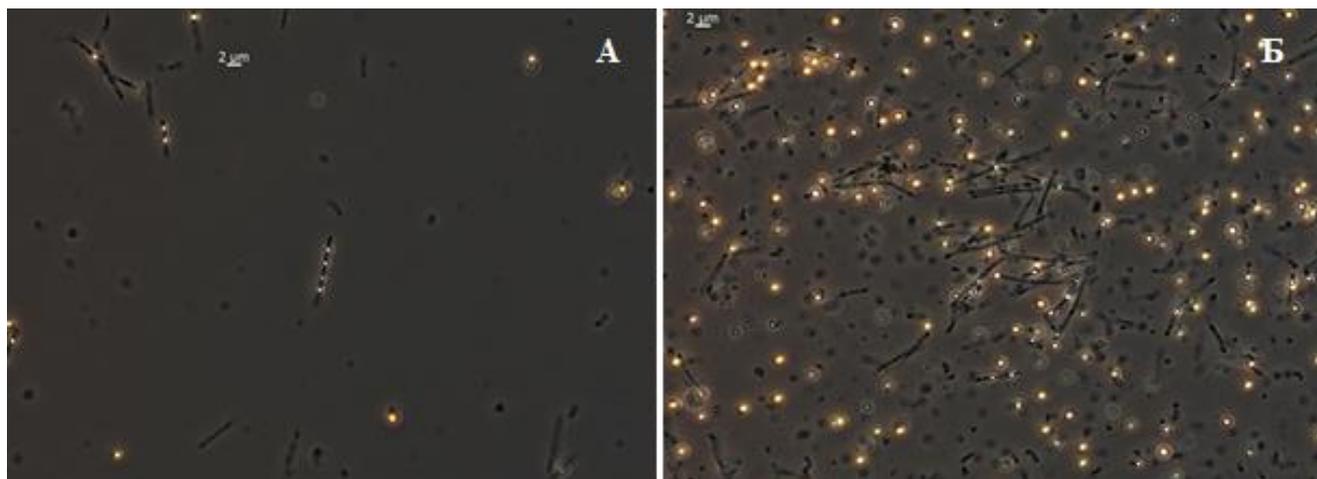


Рис. 27. Включения серы в клетках штамма SP2 при росте на сахарозе с тиосульфатом в качестве акцептора электронов (фазово-контрастная микроскопия). Маркер масштаба – 2 мкм.

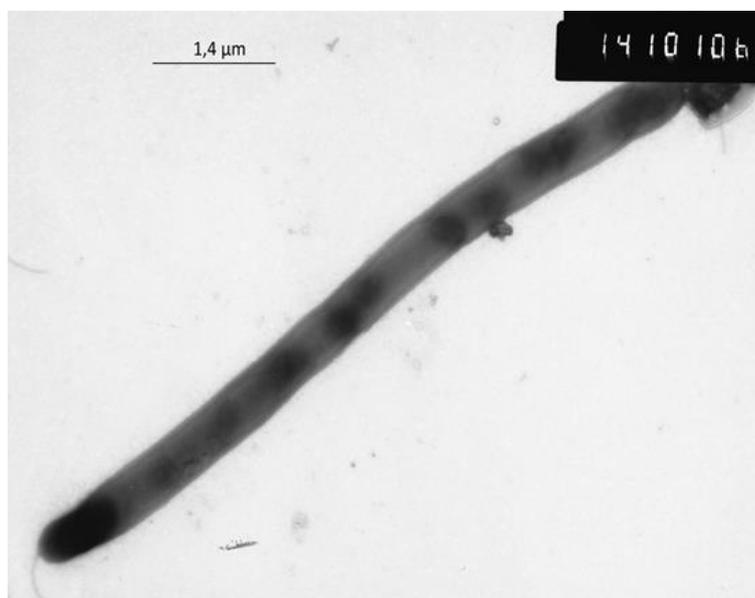


Рис. 28. Микрофотография клетки штамма SP2 с включениями серы, локализованными внутри клетки. Просвечивающая электронная микроскопия (JEOL 100С XII, Япония). Маркер масштаба – 1,4 мкм.

Штамм SP2 способен к синтрофному росту при культивировании с водород-использующими метаногенами *M. thermoautotrophicus* (выделенный в работе штамм) или *M. thermophilus B-1786* на глицерине (3,5 мМ) и лактате (25мМ). Разложение глицерина проходило без фазы задержки и завершалось в течение 3–5 сут (рис. 29).

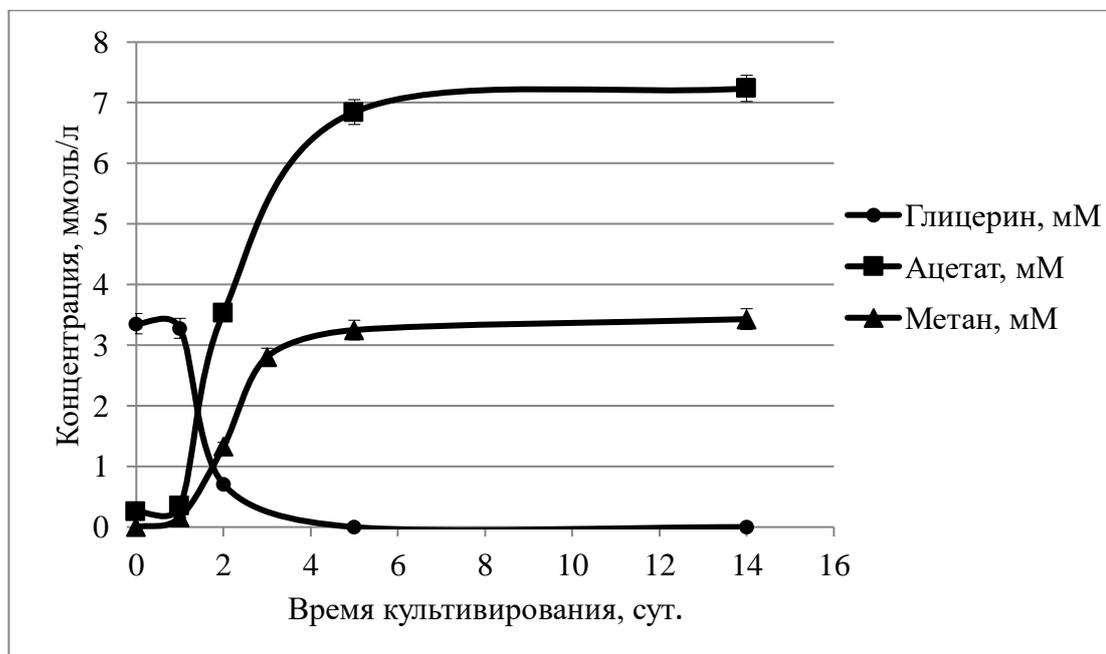


Рис. 29. Динамика синтрофного разложения глицерина штаммом SP2 при культивировании с водород-использующим метаногеном *M. thermoautotrophicus*

Разложение лактата проходило в течение 13–14 сут после длительной лаг-фазы (15–18 сут). Скорости синтрофного разложения глицерина и лактата существенно варьировали в разных экспериментах, что, согласно данным Стамса с соавт., типично. Скорости синтрофного разложения ЛЖК и других субстратов не являются постоянными для одной культуры и изменяются в зависимости от плотности водород-использующего спутника, межклеточных расстояний и многих других факторов (Stams et al., 2012). Синтрофного роста на метаноле, этаноле, ацетате, смеси ацетата и хлорида аммония, пропионате, бутирате и бетаине (5 мМ) не обнаружено.

Таксономическое положение штамма SP2.

Анализ гена 16S рНК показал, что выделенная бактерия относится к классу *Clostridia*, семейству *Thermoanaerobacteraceae*. Ближайшими филогенетическими родственниками являются *Thermoanaerobacter acetatoxydans* (93% сходства гена 16S рНК) и *T. syntrophicus* (92,8%). На основе сравнения последовательностей гена 16S рНК была построена филогенетическая дендрограмма (рис. 30). На рис. 30 видно, что выделенная бактерия

относится к семейству *Thermoanaerobacteraceae* и формирует отдельную филогенетическую группу.

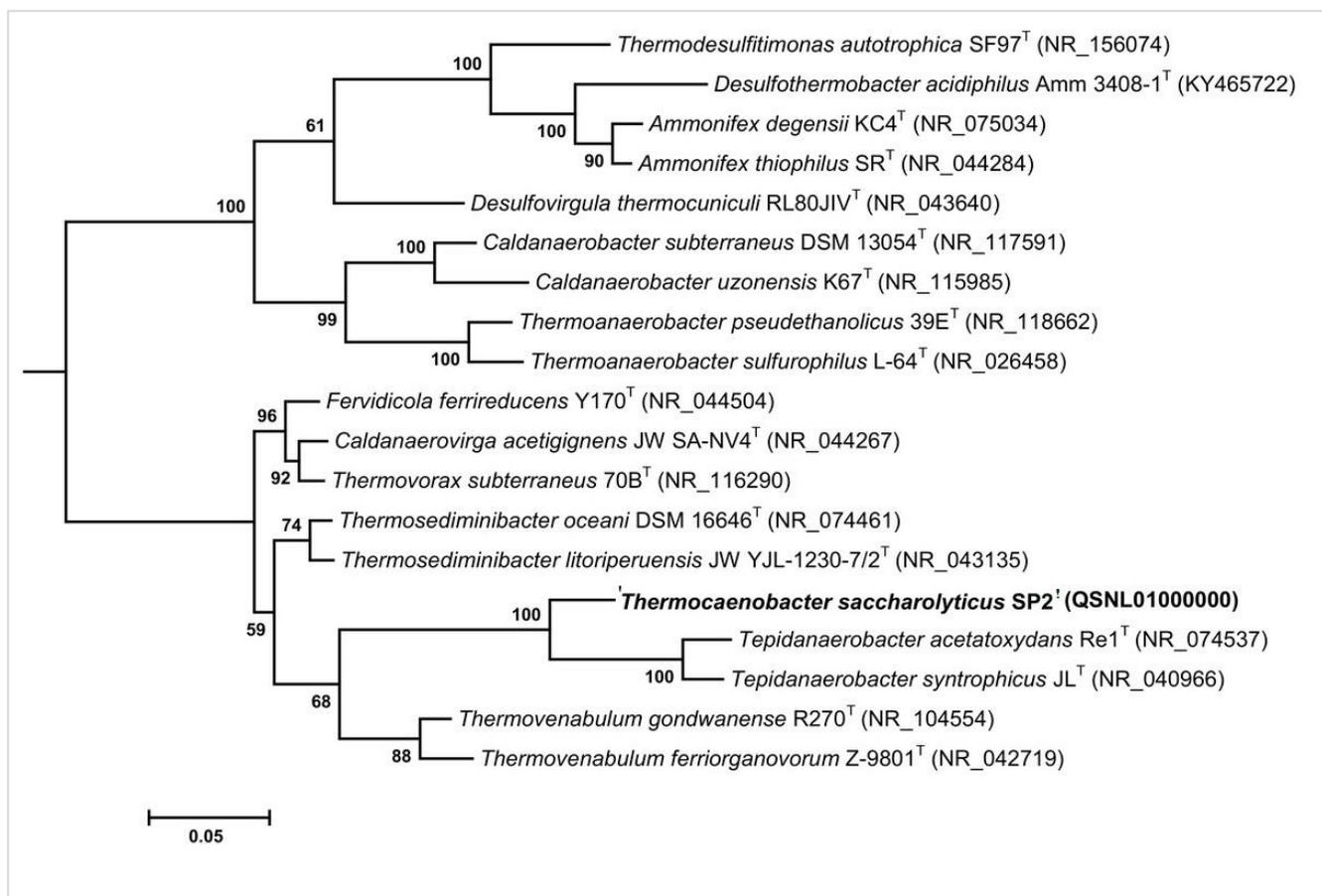


Рис. 30. Филогенетическая дендрограмма, построенная на основе сравнения последовательностей гена 16S рРНК штамма SP2 (*Thermocaenobacter saccharolyticus*) и некоторых родственных видов семейства *Thermoanaerobacteraceae*.

К другим филогенетически близким видам относятся *Thermosediminibacter oceani* DSM 16646^T, *Thermosediminibacter litoriperuensis* DSM 16647^T (Lee et al., 2005), *Thermovenabulum ferriorganovorum* Z-9801^T (Zavarzina et al., 2002), *Thermovenabulum gondwanense* R270^T (Ogg et al., 2010). Сравнение характеристик данных видов представлено в таблице 34.

Все представленные виды обладают броодильным метаболизмом с преимущественным использованием простых сахаров в качестве субстратов. Наибольшее сходство штамма SP2 наблюдается с *T. syntrophicus*: условия роста, часть субстратов для роста в чистой культуре, а также способность использовать глицерин и лактат для синтрофного роста. Однако в отличие от клеток штамма SP2 клетки *T. syntrophicus* меньше по размеру, неподвижны, не способны к спорообразованию, не образуют гранул серы при использовании тиосульфата в качестве акцептора электронов (Sekiguchi et al., 2006). *T. acetatoxydans* в отличие от SP2 растет при более низкой температуре (оптимум 37–47°C), отличается морфологически, в качестве субстрата для

синтрофного роста использует только ацетат, не нуждается в дрожжевом экстракте, как в факторе роста. Однако так же, как и SP2, *T. acetatoxydans* обладает подвижностью и способностью к спорообразованию, причем расположение спор идентичное – терминальное (т.н. «барабанная палочка») (Westerholm et al., 2010).

Родственные виды родов *Thermosediminibacter* и *Thermovenabulum* обладают более высокими оптимальными температурами роста (63–68°C). Виды отличаются оптимальными для роста значениями pH: *Thermosediminibacter litoriperuensis* предпочитает более щелочные условия, а *Thermovenabulum ferriorganovorum*, наоборот, более кислые условия среды, чем штамм SP2. Представители рода *Thermosediminibacter* помимо тиосульфата способны использовать серу и оксид марганца (IV) в качестве акцепторов электронов. В дополнение к перечисленным, *Thermovenabulum gondwanense* способен использовать оксид железа Fe (III), *Thermovenabulum ferriorganovorum* – цитрат железа Fe (III), сульфит, нитрат и фумарат (Zavarzina et al., 2002; Ogg et al., 2010). *Thermosediminibacter*, выделенные из морских осадков, отличаются от прочих видов и SP2 тем, что добавление NaCl (до 2%) стимулирует их рост (Lee et al., 2005).

На основании результатов филогенетического анализа, а также сравнения морфологических, физиологических и других дифференцирующих признаков с близкородственными видами, установили, что выделенная бактерия является представителем нового вида нового рода. Предложено название '*Thermocaenobacter saccharolyticus*'. Культура принята в коллекцию DSMZ (Германия) под номером DSM-107955.

Таблица 34. Сравнение штамма SP2 с ближайшими родственными микроорганизмами: *Tepidanaerobacter syntrophicus* JL^T, *Tepidanaerobacter acetatoxydans* Re1^T, *Thermosediminibacter oceani* DSM 16646^T, *Thermosediminibacter litoriperuensis* DSM 16647^T, *Thermovenabulum ferriorganovororum* Z-9801^T, *Thermovenabulum gondwanense* R270^T.

Характеристика	Штамм SP2	<i>Tepidanaerobacter syntrophicus</i>	<i>Tepidanaerobacter acetatoxydans</i>	<i>Thermosediminibacter oceani</i>	<i>Thermosediminibacter litoriperuensis</i>	<i>Thermovenabulum ferriorganovororum</i>	<i>Thermovenabulum gondwanense</i>
Источник выделения	Накопительная культура, устойчивая к высокой концентрации бутирата и ацетата, сброженный осадок, Москва	Сброженный осадок термофильного реактора, в котором перерабатывают ОФ-ТБО, Япония	Сброженный осадок лабораторного метантенка с высокой концентрацией аммония, Швеция	Морские осадки, Восточная акватория Тихого океана, Перу	Морские осадки, Восточная акватория Тихого океана, Перу	Горячие источники, кальдера вулкана Узон, Камчатка	Микробные маты из термального источника, Австралия
Морфология клеток	Прямые палочки разной длины	Нерегулярные палочки	Нерегулярные палочки	Нерегулярные палочки	Нерегулярные палочки	Прямые или разветвленные палочки	Прямые или слегка изогнутые палочки
Размеры клеток, мкм	Диаметр: 0,5–0,6, длина: 2,0–10,0	Диаметр: 0,6–0,8, длина: 1,5–10,0	Диаметр: 0,3–0,6, длина: 2,0–10,0	Диаметр: 0,2–0,7, длина: 1,5–16,0	Диаметр: 0,3–0,5, длина: 2,0–10,0	Диаметр: 0,5–0,6, длина: 1,5–7,0	Диаметр: 0,7–1,0, длина: 3,5–6,0
Подвижность	+	–	+	+	+	+	+
Спорообразование	+	–	+	+	+	+	–
Пределы температуры роста, °С	20–65	25–60	25–55	52–76	43–76	45–76	50–70
Оптимум температуры, °С	55–60	45–50	37–47	68	64	63–65	65
Пределы роста	3,5–8,0	5,5–8,5	4,5–9,5	6,3–9,3	5,0–9,5	4,8–8,2	6,0–9,0

при рН							
Оптimum рН для роста	7,5	7,0	7,5	7,5	7,9–8,4	6,7–6,9	7,0
Соленость,% (оптimum,%)	0–2,5 (0)	нд	нд	0–6,0 (1,0)	0–4,5 (0,5–2,0)	0–3,5	0–1
Состав жирных кислот (ЖК) в клеточной стенке		iso-C _{15:0} , C _{16:1 cis} , C _{15:1}	C18:1 w7c, C18:0, C18:1 w9c, anteiso-C17:0, C16:1 w7c	iso-C _{15:0}	iso-C _{15:0} , C _{16:1 cis} , C _{16:0} , C _{18:1 cis}	нд	нд
Г–Ц состав (% мол)	43,1	38	38	50	50	36	41
Дрожжевой экстракт	+	–	нд	–	+	+	–
Казаминовые кислоты	+	–	+	+	–	+	+
Триптон/пептон	–	–	+	+	+	+	–
Пируват	–	–	+	+	–	+	+
Ацетат	–	–	–	–	+	–	–
Лактат	–	–	–	+	+	нд	–
Глюкоза	+	+	+	+	+	–	–
Манноза	+	+	+	+	+	–	нд
Галактоза	+	+	+	+	+	–	–
Фруктоза	+	+	+	+	+	+	–
Арабиноза	–	±	–	нд	нд	–	–
Сахароза	+	+	–	+	+	+	–
Рамноза	+	нд	нд	нд	нд	нд	нд
Целобиоза	+	нд	+	+	нд	нд	нд
Раффиноза	–	+	–	+	+	нд	нд

Ксилоза	+	+	–	+	+	+	–
Цистеин	+	нд	+	нд	нд	нд	нд
Использует тиосульфат в качестве акцептора электронов	+	(образуются глобулы серы внутри клеток)	+	в присутствии лактата	+	+	+
Основные продукты сбраживания сахаров	Ацетат, этанол, Н ₂ , СО ₂	Ацетат, Н ₂ , СО ₂	Ацетат	нд	нд	Ацетат, этанол, Н ₂ , СО ₂	нд
Потребность в дрожжевом экстракте как факторе роста	+	+	–	+	+		
Способность к синтрофному росту	+	(глицерин, лактат)	+	(глицерин, лактат, этанол)	+	(ацетат)	–
	–	–	–	–	–	–	–

Характеристика '*Thermocaenobacter*' 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. *Thermocaenobacter* – термофильная палочка, выделенная из сброженного осадка сточных вод). Род '*Thermocaenobacter*' 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 '*Thermocaenobacter 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.

Основные результаты и выводы по главе 6:

Выделена термофильная облигатно анаэробная бактерия нового вида '*Thermocaenobacter saccharolyticus*' штамм SP2. '*T. saccharolyticus*' является умеренным термофилом, нейтрофилом, использует в качестве субстратов в основном простые сахара, способен к синтрофному росту на среде с глицерином и лактатом. Уникальной особенностью является накопление серы внутри и вне клеток при росте на среде с тиосульфатом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Повышение нагрузки по субстрату является одним из наиболее эффективных и активно исследуемых способов повышения производительности биореактора, в которых осуществляется переработка органических отходов (Khan et al., 2016; Shen et al., 2018). Повышение нагрузки по органическому веществу за счет снижения влажности смеси в термофильных условиях повышает риск дестабилизации процесса сбраживания вследствие накопления высоких концентраций ЛЖК (Wang et al., 2009). В результате экспериментов в периодическом режиме и в лабораторном биогазовом реакторе в непрерывных условиях показано, что ко-ферментация ОСВ с пищевыми отходами или органической фракцией ТБО позволяет существенно увеличить скорость образования и выход биогаза. Подбор оптимального соотношения субстратов в сбраживаемой смеси позволяет снизить риск дестабилизации процесса за счет более благоприятного соотношения питательных веществ. Установили, что 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.

Подбор активных инокулятов и выбор оптимальной стратегии запуска реактора обеспечивают стабильность работы реактора (Shah et al., 2014). 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 метантенков. Недостатком такого инокулята является необходимость предварительной подготовки и активации. Сброженный ОСВ является универсальным и эффективным инокулятом для инициации анаэробного сбраживания коммунальных 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 анаэробной ко-ферментации органической фракции ТБО и ОСВ, полученные в работе, соответствуют лучшим мировым показателям для лабораторных и промышленных реакторов.

На момент написания 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. При сбраживании комплексных субстратов, таких как ОСВ, а также повышении нагрузки по субстрату, ингибирующее действие полиакриламидного флокулянта становится более выраженным. 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. При этом размеры и продолжительность существования образующихся флоккул имеют критическое значение для восстановления метаногенеза.

Было показано, что при высокой нагрузке по ОВ использование химического подщелачивания не позволяет эффективно решить проблему дестабилизации вследствие избыточного накопления ЛЖК в среде. В процессе анаэробной деградации органического вещества участвуют микроорганизмы, отличающиеся скоростями роста, поэтому, поддерживая активность наиболее медленно растущих микроорганизмов на высоком уровне, можно добиться стабильной работы биореактора без использования химических реагентов. 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. При повышении нагрузки по субстрату и создании менее благоприятных условий становится более выраженной активность альтернативных путей преобразования промежуточных продуктов разложения ОВ в метан. 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*. Установлено, что выделенная бактерия относится к новому виду нового рода, для которого предложено название '*Thermocaenobacter 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 лабораторной биогазовой установке 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 флоккул, 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.

6) 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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Заварзин, Г.А. 1986. Трофические связи в метаногенном сообществе. Москва: АН СССР, сер. Биология.
2. Каллистова А.Ю., Меркель А.Ю., Тарновецкий И.Ю., Пименов Н.В. Образование и окисление метана проکاریотами // Микробиология. – 2017. – № 6. – с. 661–683.
3. Литти Ю.В., Некрасова В.К., Куликов Н.И., Симанькова М.В., Ножевникова А.Н. Обнаружение анаэробных процессов и микроорганизмов в иммобилизованном активном иле станции очистки сточных вод с интенсивной аэрацией // Микробиология. – 2013. – Т. 82. – № 6. – с. 72–75.
4. Лотош В.Е. Утилизация канализационных стоков и осадков. Научные и технические аспекты охраны окружающей среды: Обзор // ВИНТИ. – 2002. – № 6. – с. 93 – 109.
5. Мирный А.Н., Мурашов В.Е., Корецкий В.Е. Государственное управление отходами в рамках концепции устойчивого развития // Под ред. А.Н. Мирного. – Москва: Академия коммунального хозяйства им. К.Д. ПААфилова. – 2012. – 351 с.
6. Мирный, А.Н., Скворцов, Л.С., Пупырев, Е.И., и др. Санитарная очистка и уборка населенных мест: Справочник // Под ред. А.Н. Мирного. – Москва: Академия коммунального хозяйства им. К.Д. ПААфилова. – 2010. – 367 с.
7. Ножевникова А.Н., Каллистова А.Ю., Литти Ю.В., Кевбрина М.В. Биотехнология и микробиология анаэробной переработки органических коммунальных отходов // Под ред. А.Н. Ножевниковой. – Москва: Университетская книга. – 2016. – 320 с.
8. Пахненко Е.П. Осадки сточных вод и другие нетрадиционные органические удобрения. 3-е изд. // Москва: БИНОМ. Лаборатория знаний. – 2015. – 314 с.
9. Пупырев Е.И. Системы жизнеобеспечения городов // Москва: Наука. – 2006. – 246 с.
10. Abbassi-Guendouz A., Brockmann D., Trably E., Dumas C., Delgenès J.P., Steyer J.P., Escudé R. Total solids content drives high solid anaerobic digestion via mass transfer limitation // Bioresource Technology. – 2012. – V. 111. – P. 55–61.
11. Abdelgadir A., Chen X., Liu J., Xie X., Zhang J., Zhang K., Wang H., Liu N. Characteristics, process parameters, and inner components of anaerobic bioreactors // BioMed Research International. – 2014. – eP. 841573.
12. Ahmadi-Pirlou M., Ebrahimi-Nik M., Khojastehpour M., Ebrahimi S.H. Mesophilic co-digestion of municipal solid waste and sewage sludge: effect of mixing ratio, total solids, and alkaline pretreatment // International Biodeterioration & Biodegradation. – 2017. – V. 125. – P. 97–104.
13. Akuzawa M., Hori T., Haruta S., Ueno Y., Ishii M., Igarashi Y. Distinctive responses of metabolically active microbiota to acidification in a thermophilic anaerobic digester //

- Microbial Ecology. – 2011. – V.61. – N 3. – P. 595–605.
14. Amani T., Nosrati M., Mousavi S.M. Using enriched cultures for elevation of anaerobic syntrophic interactions between acetogens and methanogens in a high-load continuous digester // *Bioresource Technology*. – 2011. – V. 102. – N 4. – P. 3716–3723.
 15. Angelidaki I., Chen X., Cui J., Kaparaju P., Ellegaard L. Thermophilic anaerobic digestion of source-sorted organic fraction of household municipal solid waste: start-up procedure for continuously stirred tank reactor // *Water Research*. – 2006. – V. 40. – N 14. – P. 2621–2628.
 16. Angelidaki I., Karakashev D., Batstone D.J., Plugge C.M., Stams A.J.M. Biomethanation and its potential // *Methods Enzymol.* – 2011. – V. 494. – P. 327–351.
 17. Appels L., Baeyens J., Degrève J., Dewil R. Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge // *Progress in Energy and Combustion Science*. – 2008. – V. 34. – N 6. – P. 755–781
 18. Arhoun B., Bakkali A., El Mail R., Rodriguez-Maroto J.M., Garcia-Herruzo F. Biogas production from pear residues using sludge from a wastewater treatment plant digester. influence of the feed delivery procedure // *Bioresource Technology*. – 2013. – V. 127. – P. 242–247.
 19. Arnaiz C., Gutierrez J.C., Lebrato J. Biomass stabilization in the anaerobic digestion of wastewater sludges // *Bioresource Technology*. – 2006. – V. 97. – N 10. – P. 1179–1184.
 20. Astals S., Venegas C., Peces M., Jofre J., Lucena F., Mata-Alvarez J. Balancing hygienization and anaerobic digestion of raw sewage sludge // *Water Research*. – 2012. – V. 46. – N 19. – P. 6218–6227.
 21. Awe O.W., Zhao Y., Nzihou A., Minh D.P., Lyczko N. Anaerobic co-digestion of food waste and FOG with sewage sludge – Realising Its Potential in Ireland // *International Journal of Environmental Studies*. – 2018. – V. 75. – N 3. – P. 496–517.
 22. Balk M., Weijma J., Stams A.J.M. *Thermotoga lettingae* sp. nov., a novel thermophilic, methanol-degrading bacterium isolated from a thermophilic anaerobic reactor // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2002. – V. 52. – P. 1361–1368.
 23. Bankevich A., Nurk S., Antipov D., Gurevich A.A., Dvorkin M., Kulikov A.S., Lesin V.M., et al. SPAdes: A New Genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing // *Journal of Computational Biology*. – 2012. – V. 19. – N 5. – P. 455–477.
 24. Björnsson L, Murto M., Mattiasson B. Evaluation of parameters for monitoring an anaerobic co-digestion process // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2000. – V. 54. – N 6. – P. 844–849.
 25. Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data // *Bioinformatics*. – 2014. – V. 30. – N 15. – P. 2114–2120.

26. Bolto B., Gregory J. Organic polyelectrolytes in water treatment // *Water Research*. – 2007. – V. 41. – N 11. – P. 2301–2324.
27. Bolzonella D., Pavan P., Battistoni P., Cecchi F. Influence of the cationic flocculant Praestol K233L on the mesophilic anaerobic digestion of waste activated sludge // *Journal Of Residuals Science & Technology*. – 2005. – V. 2. – N 3. –P. 133–141.
28. Bolzonella D., Battistoni P., Mata-Alvarez J., Cecchi F. Anaerobic digestion of organic solid wastes: process behaviour in transient conditions // *Water Science and Technology*. – 2003. – V. 48. – P. 1–8.
29. Bolzonella D., Battistoni P., Susinii C., Cecchi F. Anaerobic codigestion of waste activated sludge and OFMSW: The experiences of Viareggio and Treviso plants (Italy) // *Water Science and Technology*. – 2006. – V. 53. – N 8. – P. 203–211.
30. Bolzonella D., Cavinato C., Fatone F., Pavan P., Cecchi F. High rate mesophilic, thermophilic, and temperature phased anaerobic digestion of waste activated sludge: a pilot scale study // *Waste Management*. – 2012. – V. 32. – N 6. –P. 1196–1201.
31. Bolzonella D., Pavan P., Battistoni P., Cecchi F. Mesophilic anaerobic digestion of waste activated sludge: influence of the solid retention time in the wastewater treatment process // *Process Biochemistry*. – 2005. – V. 40. – N 3–4. – P. 1453–1460.
32. Borowski S., Domański J., Weatherley L. Anaerobic Co-digestion of swine and poultry manure with municipal sewage sludge // *Waste Management*. – 2014. – V. 34. – P. 513–521.
33. Boulygina E.S., Kuznetsov B.B., Marusina A.I., Tourova T.P., Kravchenko I.K., Bykova S.A., Kolganova T.V., Galchenko V.F. Study of nucleotide sequences of nifH genes in methanotrophic bacteria // *Microbiology*. – 2002. – V. 71. – N 4. – P. 425–432.
34. Brauer S.L., Cadillo-Quiroz H., Ward R.J., Yavitt J.B., Zinder S.H. *Methanoregula boonei* gen. nov., sp. nov., an acidiphilic methanogen isolated from an acidic peat bog // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2011. – V. 61. – N 1. – P. 45–52
35. Butler J.E., Young N.D., Lovley D.R. Evolution from a respiratory ancestor to fill syntrophic and fermentative niches: comparative genomics of six *Geobacteraceae* species // *BMC Genomics*. – 2009. – V. 10. – N 1. – P. 103.
36. Callaghan F.J., Wase D.A.J., Thayanithy K., Forster C.F. Continuous codigestion of cattle slurry with fruit and vegetable wastes and chicken manure // *Biomass Bioenerg*. – 2002. – V. 27. – P. 71–77.
37. Campos E., Almirall M., Mtnez-Almela J., Palatsi J., Flotats X. Feasibility study of the anaerobic digestion of dewatered pig slurry by means of polyacrylamide // *Bioresource Technology*. – 2008. – V. 99. – N 2. – P. 387–395.
38. Campuzano R., González-Martínez S. Characteristics of the organic fraction of municipal solid

- waste and methane production: a review // *Waste Management*. – 2016. – V. 54. – P. 3–12.
39. Chen J.L., Ortiz R., Steele T.W.J., Stuckey D.C. Toxicants inhibiting anaerobic digestion: a review // *Biotechnology Advances*. – 2014. – V. 32. – N 8. – P. 1523–1534.
40. Chen Y., Cheng J.J., Creamer K.S. Inhibition of anaerobic digestion process: a review // *Bioresource Technology*. – 2008. – V. 99. – N 10. – P. 4044–4064.
41. Chu C.P., Tsai D.G., Lee D.J., Tay J.H. Size-dependent anaerobic digestion rates of flocculated activated sludge: role of intrafloc mass transfer resistance // *J. Environ. Manage.* – 2005. – V. 76. – N 3. – P. 239–244.
42. Chu C.P., Lee D.J., Chang B.V., You C.H., Liao C.S., Tay J.H. Anaerobic digestion of polyelectrolyte flocculated waste activated sludge // *Chemosphere*. – 2003. – V. 53. – N 7. – P. 757–764.
43. Chu X., Wu G., Wang J., Hu Z.H. Dry Co-digestion of sewage sludge and rice straw under mesophilic and thermophilic anaerobic conditions // *Environmental Science and Pollution Research*. – 2015. – V. 22. – N 24. – P. 20143–20153.
44. Cirne D.G., Paloumet X., Bjornsson L., Alves M.M., Mattiasson B. Anaerobic digestion of lipid-rich waste – effects of lipid concentration // *Renewable Energy*. – 2007. – V. 32. – P. 965–975.
45. Clarke W.P. The Uptake of anaerobic digestion for the organic fraction of municipal solid waste – push versus pull factors // *Bioresource Technology*. – 2018. – V. 249. – P. 1040–1043.
46. Colleran E, Pender S. Mesophilic and thermophilic anaerobic digestion of sulphate-containing wastewaters // *Water Science and Technology*. – 2002. – V. 45. – N 10. – P. 231–235.
47. Connaughton S., Collins G., O’Flaherty V. Psychrophilic and mesophilic anaerobic digestion of brewery effluent: a comparative study // *Water Research*. – 2006. – V. 40. – P. 2503–2510.
48. Dai X., Luo F., Yi J., He Q., Dong B. Biodegradation of polyacrylamide by anaerobic digestion under mesophilic condition and its performance in actual dewatered sludge system // *Bioresource Technology*. – 2014. – V. 153. – P. 55–61.
49. De Baere L., Mattheeuws B. Anaerobic digestion of the organic fraction of municipal solid waste in Europe – Status, experience and prospects // *Waste Management*. – 2014. – V. 3. – P. 517–526.
50. de Bok F.A.M., Stams A.J.M., Dijkema C., Boone D.R. Pathway of propionate oxidation by a syntrophic culture of *Smithella Propionica* and *Methanospirillum Hungatei* // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2001. – V. 67. – N 4. –P. 1800–1804.
51. De la Rubia M.A., Riau V., Raposo F., Borja R. Thermophilic anaerobic digestion of sewage sludge: focus on the influence of the start-up. a review // *Critical Reviews in Biotechnology*. – 2013. – V. 33. – N 4. – P. 448–460.

52. Demirel B., Yenigün O. The effects of change in volatile fatty acid (VFA) composition on methanogenic upflow filter reactor (UFAF) performance // *Environmental Technology*. – 2002. – V. 23. – N 10. – P. 1179–1187.
53. den Boer E., Jędrzak A., Kowalski Z., Kulczycka J., Szpadt R. A Review of municipal solid waste composition and quantities in Poland // *Waste Management*. – 2010. – V. 30. – N 3. – P. 369–377.
54. Dinsdale R.M., Premier G.C., Hawkes F.R., Hawkes D.L. Two-stage anaerobic co-digestion of waste activated sludge and fruit/vegetable waste using inclined tubular digesters // *Bioresour. Technol.* – 2000. – V. 72. – P. 149–158.
55. Dogan T., Ince O., Oz N.A., Ince B.K. Inhibition of volatile fatty acid production in granular sludge from a UASB reactor // *Journal of Environmental Science and Health. Part A, Toxic/hazardous Substances & Environmental Engineering*. – 2005. – V. 40. – N 3. – P. 633–644.
56. Dolfing J. Thermodynamic constraints on syntrophic acetate oxidation // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2014. – V. 80. – N 4. – P. 1539–1544.
57. Dridi B., Fardeau M.L., Ollivier B., Raoult D., Drancourt M. *Methanomassiliicoccus luminyensis* gen. nov., sp. nov., a methanogenic archaeon isolated from human faeces // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2012. – V. 62. – P. 1902–1907.
58. Duan N., Dong B., Wu B., Dai X. High-solid anaerobic digestion of sewage sludge under mesophilic conditions: feasibility study // *Bioresource Technology*. – 2012. – V. 104. – P. 150–156.
59. El-Mamouni R., Leduc R., Guiot S.R. Influence of synthetic and natural polymers on anaerobic granulation process // *Water Science and Technology*. – 1998. – V. 38. – N 8–9. – P. 341–347.
60. El-Mamouni R., Frigon J.C., Hawari J., Marroni D., Guiot S.R. Combining photolysis and bioprocesses for mineralization of high molecular weight polyacrylamides // *Biodegradation*. – 2002. – V. 13. – N 4. – P. 221–227.
61. El-Mashad H.M., Zhang R. Biogas production from co-digestion of dairy manure and food waste // *Bioresource Technology*. – 2010. – V. 101. – N 11. – P. 4021–4028.
62. Enzmann F., Mayer F., Rother M., Holtmann D. Methanogens: biochemical background and biotechnological applications // *AMB Express*. – 2018. – V. 8. – N 1. – P. 1.
63. Esposito G., Frunzo L., Giordano A., Liotta F., Panico A., Pirozzi F. Anaerobic co-digestion of organic wastes // *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*. – 2012. – V. 11. – P. 325–341.
64. Evans P.N., Parks D.H., Chadwick G.L., Robbins S.J., Orphan V.J., Golding S.D., Tyson G.W.

- Methane Metabolism in the Archaeal Phylum Bathyarchaeota Revealed by Genome-Centric Metagenomics // *Science*. – 2015. – V. 350. – P. 434–438.
65. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap // *Evolution*. – 1985. – V. 39. – N 4. – P. 783–791.
66. Ferguson R.M.W., Coulon F., Villa R. Organic Loading Rate: A promising microbial management tool in anaerobic digestion // *Water Research*. – 2016. – V. 100. – P. 348–356.
67. Ferry J.G. Fundamentals of methanogenic pathways that are key to the biomethanation of complex biomass // *Current Opinion in Biotechnology*. – 2011. – V. 22. – N 3. – P. 351–357.
68. Fisgativa H., Tremier A., Dabert P. Characterizing the variability of food waste quality: a need for efficient valorisation through anaerobic digestion // *Waste Management*. – 2016. – V. 50. – P. 264–274.
69. Forster-Carneiro T., Pérez M., Romero L.I., Sales D. Dry-thermophilic anaerobic digestion of organic fraction of the municipal solid waste: focusing on the inoculum sources // *Bioresource Technology*. – 2007. – V. 98. – N 17. – P. 3195–3203.
70. Fotidis I.A., Karakashev D., Angelidaki I. Bioaugmentation with an acetate-oxidising consortium as a tool to tackle ammonia inhibition of anaerobic digestion // *Bioresource Technology*. – 2013. V. 146. – P. 57–62.
71. Fujishima S., Miyahara T., Noike T. Effect of Moisture content on anaerobic digestion of dewatered sludge: ammonia inhibition to carbohydrate removal and methane production // *Water Science and Technology*. – 2000. – V. 41. – N 3. – P. 119–127.
72. Gagliano M.C., Ismail S.B., Stams A.J.M., Plugge C.M., Temmink H., Van Lier J.B. Biofilm formation and granule properties in anaerobic digestion at high salinity // *Water Research*. – 2017. – V. 121. – P. 61–71.
73. Giard D., Choiniere D., Cordeau S., Barrington S. Biogas generation from in-storage psychrophilic anaerobic digestion // *Environmental Technology*. – 2013. – V. 34. – N 8. – P. 1007–1015.
74. Gonzalez-Fernandez C., Nieto-Diez P.P., Leon-Cofreces C., Garcia-Encina P.A. Solids and nutrients removals from the liquid fraction of swine slurry through screening and flocculation treatment and Influence of these processes on anaerobic biodegradability // *Bioresource Technology*. – 2008. – V. 99. – P. 6233–6239.
75. Goux X., Calusinska M., Fossépré M., Benizri E., Delfosse P. Start-up phase of an anaerobic full-scale farm reactor – appearance of mesophilic anaerobic conditions and establishment of the methanogenic microbial community // *Bioresource Technology*. – 2016. – V. 212. – P. 217–226.
76. Guendouz J., Buffière P., Cacho J., Carrère M., Delgenes J.P. High-solids anaerobic digestion:

- comparison of three pilot scales // *Water Science and Technology*. – 2008. – V. 58. – N 9. – P. 1757–1763.
77. Habiba L., Hassib B., Moktar H. Improvement of activated sludge stabilization and filterability during anaerobic digestion by fruit and vegetable waste addition // *Bioresour. Technol.* – 2009. – V. 100. – P. 1555–1560.
78. Hansen K.H., Angelidaki I., Ahring B.K. Anaerobic digestion of swine manure: inhibition by ammonia // *Water Res.* – 1998. – V. 32. – P. 5–12.
79. Hao L.P., Lü F., He P.J., Li L., Shao L.M. Predominant contribution of syntrophic acetate oxidation to thermophilic methane formation at high acetate concentrations // *Environmental Science & Technology*. – 2011. – V. 45. – N 2. – P. 508–513.
80. Hattori S., Kamagata Y., Hanada S., Shoun H. *Thermacetogenium phaeum* gen. nov., sp. nov., a strictly anaerobic, thermophilic, syntrophic acetate-oxidizing bacterium // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2000. – V.50. – N 4. – P. 1601–1609.
81. Hattori S. Syntrophic Acetate-oxidizing microbes in methanogenic environments // *Microbes and Environments*. – 2008. – V. 23. – N 2. – P. 118–127.
82. Heo N.H., Park S.C., Lee J.S., Kang H., Park D.H. Single-stage anaerobic co-digestion for mixture wastes of simulated korean food waste and waste activated sludge // *App. Biochem. Biotechnol.* – 2003. – V. 105. – P. 567–579.
83. Heo N.H., Park S.C., Kang H. Effects of mixture ratio and hydraulic retention time on single-stage anaerobic co-digestion of food waste and waste activated sludge // *Journal of Environmental Science and Health. Part A, Toxic/hazardous Substances & Environmental Engineering*. – 2004. – V. 39. – N 7. – P. 1739–1756.
84. Hidaka T., Wang F., Togari T., Uchida T., Suzuki Y. Comparative performance of mesophilic and thermophilic anaerobic digestion for high-solid sewage sludge // *Bioresource Technology*. – 2013. – V. 149. – P. 177–183.
85. Ho D.P., Jensen P.D., Batstone D.J. *Methanosarcinaceae* and acetate-oxidizing pathways dominate in high-rate thermophilic anaerobic digestion of waste-activated sludge // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2013. – V. 79. – N 20. – P. 6491–6500.
86. Hulshoff Pol L.W., de Zeeuw W.J., Velzeboer C.T.M., Lettinga G. Granulation in UASB reactors // *Water Science and Technology*. – 1983. – V. 15. – P. 291–304.
87. Hungate R.E. A Roll Tube method for cultivation of strict anaerobes // *Methods in microbiology* / Edit. by Ribbons D.W., Norris J.R., 13th ed. – New York: Acad. – 1969.
88. Iacovidou E., Ohandja D.G., Voulvoulis N. Food waste co-digestion with sewage sludge – realising its potential in the UK // *Journal of Environmental Management*. – 2012. – V. 112. – P. 267–274.

89. Ibrahim V., Hey T., Jönsson K. Determining short chain fatty acids in sewage sludge hydrolysate: a comparison of three analytical methods and investigation of sample storage effects // *Journal of Environmental Sciences*. – 2014. – V. 26. – P. 926–933.
90. Iino T., Tamaki H., Tamazawa S., Ueno Y., Ohkuma M., Suzuki K.I., Igarashi Y., Haruta S. *Candidatus* Methanogranum Caenicola: a novel methanogen from the anaerobic digested sludge, and proposal of *Methanomassiliicoccaceae* fam. nov. and *Methanomassiliicoccales* ord. nov., for a methanogenic lineage of the class *Thermoplasmata* // *Microbes and Environments*. – 2013. – V. 28. – N 2. – P. 244–250.
91. Ike M., Inoue D., Miyano T., Liu T.T., Sei K., Soda S., Kadoshin S. Microbial population dynamics during startup of a full-scale anaerobic digester treating industrial food waste in Kyoto eco-energy project // *Bioresource Technology*. – 2010. – V. 101. – N 11. – P. 3952–3957.
92. Illmer P, Gstraunthaler G. Effect of seasonal changes in quantities of biowaste on full scale anaerobic digester performance // *Waste Management*. – 2009. – V. 29. – P. 162–167.
93. Imachi H., Akiyoshi O., Sekiguchi Y., Hanada S., Harada H., Kamagata Y. *Pelotomaculum thermopropionicum* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, thermophilic, syntrophic propionate-oxidizing bacterium // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2002. – V. 52. – N 5. – P. 1729–1735.
94. Ito T., Yoshiguchi K., Ariesyady H.D., Okabe S. Identification of a novel acetate-utilizing bacterium belonging to *Synergistes* group 4 in anaerobic digester sludge // *The ISME Journal*. – 2011. – V. 5. – N 12. – P. 1844–1856.
95. Jang H.M., Kim J.H., Ha J.H., Park J.M. Bacterial and methanogenic archaeal communities during the single-stage anaerobic digestion of high-strength food wastewater // *Bioresource Technology*. – 2014. – V. 165. – P. 174–182.
96. Wilson K. Preparation of genomic DNA from bacteria // *Curr Protoc Mol Biol*. – Chapter 2. – Unit 2.4. – 2001.
97. Kallistova A.Yu., Goel G., Nozhevnikova A.N. Microbial diversity of methanogenic communities in the systems for anaerobic treatment of organic waste // *Microbiology*. – 2014. – V. 83. – N 5. – P. 462–483.
98. Kalyanamoorthy S., Minh B.Q., Wong T.K.F., von Haeseler A., Jermin L.S. ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates // *Nature Methods*. – 2017. – V. 14. – N 6. – P. 587–589.
99. Kato S., Watanabe K. Ecological and evolutionary interactions in syntrophic methanogenic consortia // *Microbes and Environments*. – 2010. – V. 25. – N 3. – P. 145–151.
100. Kawai M., Nagao N., Tajima N., Niwa C., Matsuyama T., Toda T. The effect of the labile

- organic fraction in food waste and the substrate/inoculum ratio on anaerobic digestion for a reliable methane yield // *Bioresource Technology*. – 2014. – V. 157. – P. 174–180.
101. Kay-Shoemake J.L., Watwood M.E., Lentz R.D., Sojka R.E. Polyacrylamide as an organic nitrogen source for soil microorganisms with potential effects on inorganic soil nitrogen in agricultural soil // *Soil Biol. Biochem.* – 1998. – V. 30. – N 8/9. – P. 1045–1052.
102. Khalid A., Arshad M., Anjum M., Mahmood T., Dawson L. The anaerobic digestion of solid organic waste // *Waste Management*. – 2011. – V. 31. – N 8. – P. 1737–1744.
103. Khan M.A., Ngo H.H., Guo W.S., Liu Y., Nghiem L.D., Hai F.I., Deng L.J., Wang J., Wu Y. Optimization of process parameters for production of volatile fatty acid, biohydrogen and methane from anaerobic digestion // *Bioresource Technology*. – 2016. – V. 219. – P. 738–748.
104. Kim B.C., Grote R., Lee D.W., Antranikian G., Pyun Y.R. *Thermoanaerobacter yonseiensis* sp. nov., a novel extremely thermophilic, xylose-utilizing bacterium that grows at up to 85 degrees C // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2001. – V. 51. – N 4. – P. 1539–1548.
105. Kim H.W., Han S.K., Shin H.S. Simultaneous treatment of sewage sludge and food waste by the unified high-rate anaerobic digestion system // *Water Science and Technology*. – 2006. – V. 53. – N 6. – P. 29–35.
106. Kozianowski G., Canganella F., Rainey F.A., Hippe H., Antranikian G. Purification and characterization of thermostable pectate-lyases from a newly isolated thermophilic bacterium, *Thermoanaerobacter italicus* sp. nov. // *Extremophiles: Life under Extreme Conditions*. – 1997. – V. 1. – N 4. – P. 171–182.
107. Kugelman I.J., McCarty P.L. Cation toxicity and stimulation in anaerobic waste treatment // *Water Pollution Control Fed.* – 1964. – V. 37. – P. 97–116.
108. Lane D.J. 16S/23S Sequencing // *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. – New York: John Wiley and Sons, Ltd. – 1991. – P. 115–175.
109. Lang K., Schuldes J., Klingl A., Poehlein A., Daniel R., Brune A. New mode of energy metabolism in the seventh order of methanogens as revealed by comparative genome analysis of ‘*Candidatus Methanoplasma termitum*’ // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2015. – V. 81. – N 4. – P. 1338–1352.
110. Lay J.J., Li Y.Y., Noike T., Endo J., Ishimoto S. Analysis of environmental-factors affecting methane production from high-solids organic waste // *Water Science and Technology*. – 1997. – V. 36. – N 6–7. – P. 493–500.
111. Lee C.S., Robinson J., Chong M.F. A Review on application of flocculants in wastewater treatment // *Process Safety and Environmental Protection*. – 2014. – V. 92. – P. 489–508.
112. Lee S.H., Park J.H., Kim S.H., Yu B.J., Yoon J.J., Park H.D. Evidence of syntrophic acetate

- oxidation by *Spirochaetes* during anaerobic methane production // *Bioresource Technology*. – 2015. – V. 190. – P. 543–549.
113. Lee Y.J., Dashti M., Prange A., Rainey F.A., Rohde M., Whitman W.B., Wiegel J. *Thermoanaerobacter sulfurigignens* sp. nov., an anaerobic thermophilic bacterium that reduces 1 M thiosulfate to elemental sulfur and tolerates 90 mM sulfite // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2007. – V. 57. – P. 1429–1434.
114. Lee Y.J., Wagner I.D., Brice M.E., Kevbrin V.V., Mills G.L., Romanek C.S., Wiegel J. *Thermosediminibacter oceani* gen. nov., sp. nov. and *Thermosediminibacter litoriperuensis* sp. nov., new anaerobic thermophilic bacteria isolated from Peru margin // *Extremophiles: Life under Extreme Conditions*. – 2005. – V. 9. – N 5. – P. 375–383.
115. Leite A., Janke L., Lv Z., Harms H., Richnow H.H., Nikolausz M. Improved monitoring of semi-continuous anaerobic digestion of sugarcane waste: effects of increasing organic loading rate on methanogenic community dynamics // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2015. – V. 16. – N 10. – P. 23210–23226.
116. Li Q., Li H., Wang G., Wang X. Effects of loading rate and temperature on anaerobic co-digestion of food waste and waste activated sludge in a high frequency feeding system, looking in particular at stability and efficiency // *Bioresource Technology*. – 2017. – V. 237. – P. 231–239.
117. Li Y., Park S.Y., Zhu J. Solid-State anaerobic digestion for methane production from organic waste // *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. – 2011. – V. 15. – P. 821–826.
118. Lins P., Malin C., Wagner A.O., Illmer P. Reduction of accumulated volatile fatty acids by an acetate-degrading enrichment culture // *FEMS Microbiology Ecology*. – 2010. – V. 71. – N 3. – P. 469–478.
119. Liotta F., D'Antonio G., Esposito G., Fabbricino M., Frunzo L., van Hullebusch E.D., Lens P.N.L., Pirozzi F. Effect of moisture on disintegration kinetics during anaerobic digestion of complex organic substrates // *Waste Management & Research*. – 2014. – V. 32. – N 1. – P. 40–48.
120. Liotta F., D'Antonio G., Esposito G., Fabbricino M., Frunzo L., van Hullebusch E.D., Lens P.N.L., Pirozzi F., Pontoni L. Effect of total solids content on methane and volatile fatty acid production in anaerobic digestion of food waste // *Waste Management & Research*. – 2014. – V. 32. – N 10. – P. 947–953.
121. Liu Y., Whitman W.B. Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic archaea // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 2008. – V. 1125. – P. 171–189.
122. Lu L., Pan Z., Hao N., Peng W. A novel acrylamide-free flocculant and its application for sludge dewatering // *Water Research*. – 2014. – V. 57. – P. 304–312.

123. Ma K. *Methanosaeta harundinacea* sp. nov., a novel acetate-scavenging methanogen isolated from a UASB reactor // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2006. – V. 56. – P. 127–131.
124. Madigan M.T., Marris B.L. Extremophiles // *Scientific American*. – 1997. – V. 276. – P. 82–87.
125. Mahmoud N., Zeeman G., Gijzen H., Lettinga G. Solids removal in upflow anaerobic reactors, a review // *Bioresource Technology*. – 2003. – V. 90. – N 1. – P. 1–9.
126. Mata-Alvarez J., Dosta J., Romero-Güiza M.S., Fonoll X., Peces M., Astals S. A critical review on anaerobic co-digestion achievements between 2010 and 2013 // *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. – 2014. – V. 36. – P. 412–427.
127. Mata-Alvarez J., Dosta J., Macé S., Astals S. Codigestion of Solid wastes: a review of its uses and perspectives including modeling // *Critical Reviews in Biotechnology*. – 2011. – V. 31. – N 2. – P. 99–111.
128. Maune M.W., Tanner R.S. Description of *Anaerobaculum hydrogeniformans* sp. nov., an anaerobe that produces hydrogen from glucose, and emended description of the genus *Anaerobaculum* // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2012. – V. 62. – P. 832–838.
129. Mayumi D., Mochimaru H., Tamaki H., Yamamoto K., Yoshioka H., Suzuki Y., Kamagata Y., Sakata S. Methane production from coal by a single methanogen // *Science*. – 2016. – V. 354. – P. 222–225.
130. McInerney M.J., Struchtemeyer C.G., Sieber J., Mouttaki H., Stams A.J.M., Schink B., Rohlin L., Gunsalus R.P. Physiology, ecology, phylogeny, and genomics of microorganisms capable of syntrophic metabolism // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 2008. – V. 1125. – P. 58–72.
131. McInerney M.J., Sieber J.R., Gunsalus R.P. Syntrophy in anaerobic global carbon cycles // *Current Opinion in Biotechnology*. – 2009. – V. 20. – N 6. – P. 623–632.
132. McKeown R.M., Scully C., Enright A.M., Chinalia F.A., Lee C., Mahony T., Collins G., O’Flaherty V. Psychrophilic methanogenic community development during long-term cultivation of anaerobic granular biofilms // *The ISME Journal*. – 2009. – V. 3. – N 11. – P. 1231–1242.
133. McMahon K.D., Zheng D., Stams A.J.M., Boone D., Mackie R.I., Raskin L. Microbial population dynamics during startup and overload conditions of anaerobic digesters treating municipal solid waste and sewage sludge // *Biotechnol. Bioeng.* – 2004. – V. 87. – N 7. – P. 823–834.
134. Moen G., Stensel H.D., Lepistö R., Ferguson J.F. Effect of solids retention time on the

- performance of thermophilic and mesophilic digestion of combined municipal wastewater sludges // *Water Environment Research: A Research Publication of the Water Environment Federation.* – 2003. – V. 75. – N 6. – P. 539–548.
135. Moñino P., Jiménez E., Barat R., Aguado D., Seco A., Ferrer J. Potential use of the organic fraction of municipal solid waste in anaerobic co-digestion with wastewater in submerged anaerobic membrane technology // *Waste Management.* – 2016. – V. 56. – P. 158–165.
136. Namsaraev Z.B., Gotovtsev P.M., Komova A.V., Vasilov R.G. Current status and potential of bioenergy in the Russian Federation // *Renewable and Sustainable Energy Reviews.* – 2018. – V. 81. – P. 625–634.
137. Nguyen L.T., Schmidt H.A., von Haeseler A., Minh B.Q. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies // *Molecular Biology and Evolution.* – 2015. – V. 32. – P. 268–274.
138. Nobu M.K., Narihiro T., Kuroda K., Mei R., Liu W.T. Chasing the elusive *Euryarchaeota* class WSA2: genomes reveal a uniquely fastidious methyl-reducing methanogen // *The ISME Journal.* – 2016. – V. 10. – N 10. – P. 2478–2487.
139. Nozhevnikova A.N., Nekrasova V., Ammann A., Zehnder A.J.B., Wehrli B., Holliger C. Influence of temperature and high acetate concentrations on methanogenesis in lake sediment slurries // *FEMS Microbiology Ecology.* – 2007. – V. 62. – N 3. – P. 336–344.
140. Nozhevnikova A.N., Rebak S., Kotsyurbenko O.R., Parshina S.N., Holliger C., Lettinga G. Anaerobic production and degradation of volatile fatty acids in low temperature environments // *Water Science and Technology.* – 2000. – V. 41. – P. 39–46.
141. Ogg C.D., Greene A.C., Patel B.K.C. *Thermovenabulum gondwanense* sp. nov., a thermophilic anaerobic Fe(III)-reducing bacterium isolated from microbial mats thriving in a great artesian basin bore runoff channel // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* – 2010. V. 60. – P. 1079–1084.
142. Omil F., Lens P., Hulshoff Pol L.W., Lettinga G. Effect of upward velocity and sulphide concentration on volatile fatty acid degradation in a sulphidogenic granular sludge reactor // *Process Biochem.* – 1996. – V. 31. – P. 699–710.
143. Pal S., Sen G., Ghosh S., Singh R.P. High performance polymeric flocculants based on modified polysaccharides-microwave assisted synthesis // *Carbohydr.Polym.* – 2012. – V. 87. – P. 336–342.
144. Parkin G.F., Lynch N.A., Kuo W., Van Keuren E.L., Bhattacharya S.K. Interaction between sulfate reducers and methanogens fed acetate and propionate // *Water Pollution Control Fed.* – 1990. – V. 62. – P. 780–788.
145. Parshina S.N., Ermakova A.V., Bomberg M., Detkova E.N. *Methanospirillum stamsii* sp.

- nov., a psychrotolerant, hydrogenotrophic, methanogenic archaeon isolated from an anaerobic expanded granular sludge bed bioreactor operated at low temperature // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2014. – V. 64. – P. 180–186.
146. Pathak A., Dastidar M.G., Sreekrishnan T.R. Bioleaching of heavy metals from sewage sludge: a review // *Journal of Environmental Management*. – 2009. – V. 90. – N 8. – P. 2343–2353.
147. Pauly M., Keegstra K. Cell-wall carbohydrates and their modification as a resource for biofuels // *The Plant Journal*. – 2008. – V. 54. – N 4. – P. 559–568.
148. Pavan P., Bolzonella D., Battistoni E., Cecchi F. Anaerobic co-digestion of sludge with other organic wastes in small wastewater treatment plants: an economic considerations evaluation // *Water Science and Technology*. – 2007. – V. 56. – N 10. – P. 45–53.
149. Pérez-Elvira S.I., Fdz-Polanco M., Fdz-Polanco F. Enhancement of the conventional anaerobic digestion of sludge: comparison of four different strategies // *Water Science and Technology*. – 2011. – V. 64. – N 2. – P. 375–383.
150. Pfennig N. Anreicherungskulturen für rote und grüne schwefelbakterien // *Zbl. Bakt. I.Abt. Orig. Suppl.* – 1965. – V. 1. – P. 179–89.
151. Pfennig N., Lippert K.D. Über Das vitamin B12 – Bedürfnis phototropher schwefelbakterien // *Arch. Microbiol.* – 1966. – V. 55. – P. 245–246.
152. Ponsá S., Ferrer I., Vázquez F., Font X. Optimization of the hydrolytic-acidogenic anaerobic digestion stage (55°C) of sewage sludge: influence of pH and solid content // *Water Research*. – 2008. – V. 42. – N 14. – P. 3972–3980.
153. Pullammanappallil P.C., Chynoweth D.P., Lyberatos G., Svoronos S.A. Stable performance of anaerobic digestion in the presence of a high concentration of propionic acid // *Bioresource Technology*. – 2001. – V. 78. – N 2. – P. 165–169.
154. Purcell B., Stentiford E.I. Co-digestion – enhancing the recovery of organic waste // *ORBIT Journal*. – 2000.
155. Raposo F., De la Rubia M.A., Fernandez-Cegri V., Borja R. Anaerobic digestion of solid organic substrates in batch mode: an overview relating to methane yields and experimental procedures // *Renew. Sustain. Energy Rev.* – 2011. – V. 16. – P. 861–877.
156. Renault F., Sancey B., Badot P.M., Crini G. Chitosan for coagulation/flocculation processes – an eco-friendly approach // *Eur. Polym. J.* – 2009. – V. 45. – P. 1337–1348.
157. Rospert S., Breitung J., Ma K., Schwörer B., Zirngibl C., Thauer R.K., Linder D., Huber R., Stetter K.O. Methyl-coenzyme M reductase and other enzymes involved in methanogenesis from CO₂ and H₂ in the extreme thermophile *Methanopyrus kandleri* // *Archives of Microbiology*. – 1991. – V. 156. – P. 49–55.

158. Rughoonundun H., Mohee R., Holtzaple M.T. Influence of carbon-to-nitrogen ratio on the mixed-acid fermentation of wastewater sludge and pretreated bagasse // *Bioresource Technology*. – 2012. – V. 112. – P. 91–97.
159. Saady N.M.C., Massé D.I. A start-up of psychrophilic anaerobic sequence batch reactor digesting a 35% total solids feed of dairy manure and wheat straw // *AMB Express*. – 2015. – V. 5. – N 1. – eP 144.
160. Sakai S., Imachi H., Hanada S., Ohashi A., Harada H., Kamagata Y. *Methanocella paludicola* gen. nov., sp. nov., a methane-producing archaeon, the first isolate of the lineage ‘rice cluster i’, and proposal of the new archaeal order *Methanocellales* ord. nov. // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2008. – V. 58. – N 4. – P. 929–936.
161. Sánchez C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi // *Biotechnology Advances*. – 2009. – V. 27. – N 2. – P. 185–194.
162. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1977. – V. 74. – N 12. – P. 5463–5467.
163. Santibañez-Aguilar J.E., Ponce-Ortega J.M., González-Campos J.B., Serna-González M., El-Halwagi M.M. Optimal planning for the sustainable utilization of municipal solid waste // *Waste Management*. – 2013. – V. 33. – N 12. – P. 2607–2622.
164. Sasaki D., Hori T., Haruta S., Ueno Y., Ishii M., Igarashi Y. Methanogenic pathway and community structure in a thermophilic anaerobic digestion process of organic solid waste // *Journal of Bioscience and Bioengineering*. – 2011. – V. 111. – N 1. – P. 41–46.
165. Shah A.F., Mahmood Q., Shah M.M., Pervez A., Asad S.A. Microbial ecology of anaerobic digesters: the key players of anaerobiosis // *The Scientific World Journal*. – 2014. – eP. 183752. – P. 1–21.
166. Schink B. Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. – 1997. – V. 61. – N 2. – P. 262–280.
167. Schnürer A., Jarvis A. Microbiological handbook for biogas plants // *Swedish Waste Management*. – Malme: Swedish Gas Centre. – 2010. – Report 207.
168. Schnurer A., Schink B., Svensson B.H. *Clostridium ultunense* sp. nov., a mesophilic bacterium oxidizing acetate in syntrophic association with a hydrogenotrophic methanogenic bacterium // *International Journal of Systematic Bacteriology*. – 1996. – V. 46. – N 4. – P. 1145–1152.
169. Schnürer A. Biogas production: microbiology and technology // *Adv Biochem Eng Biotechnol*. – 2016. – V. 156. – P. 195 – 234.
170. Seady A.T., Owen N., Hellstrom H., Kang H. Source separation of MSW: an overview of the

- source separation and separate collection of the digestible fraction of household waste, and of other similar wastes from municipalities, aimed to be used as feedstock for anaerobic digestion in biogas plants // IEA Bioenergy. – 2013. – P. 1–52.
171. Sekiguchi Y., Imachi H., Susilorukmi A., Muramatsu M., Ohashi A., Harada H., Hanada S., Kamagata Y. *Tepidanaerobacter syntrophicus* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, moderately thermophilic, syntrophic alcohol- and lactate-degrading bacterium isolated from thermophilic digested sludges // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2006. – V. 56. – P. 1621–1629.
172. Shen F., Li H., Wu X., Wang Y., Zhang Q. Effect of organic loading rate on anaerobic co-digestion of rice straw and pig manure with or without biological pretreatment // Bioresource Technology. – 2018. – V. 250. – P. 155–162.
173. Siles J.A., Brekelmans J., Martín M.A., Chica A.F., Martín A. Impact of ammonia and sulphate concentration on thermophilic anaerobic digestion // Bioresource Technology. – 2010. – V. 101. – N 23. – P. 9040–9048.
174. Sorokin D.Y., Abbas B., Merkel A.Y., Rijpstra W.I., Damsté J.S., Sukhacheva M.V., van Loosdrecht M.C. *Methanosalsum natronophilum* sp. nov., and *Methanocalculus alkaliphilus* sp. nov., haloalkaliphilic methanogens from hypersaline soda lakes // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2015. – V. 65. – N 10. – P. 3739–3745.
175. Sorokin D.Y., Makarova K.S., Abbas B., Ferrer M., Golyshin P.N., Galinski E.A., Ciordia S., et al. Discovery of extremely halophilic, methyl-reducing euryarchaea provides insights into the evolutionary origin of methanogenesis // Nature Microbiology. – 2017. – V. 2. – eP. 17081.
176. Stamps B.W., Lyles C.N., Suflita J.M., Masoner J.R., Cozzarelli I.M., Kolpin D.W., Stevenson B.S. Municipal solid waste landfills harbor distinct microbiomes // Frontiers in Microbiology. – 2016. – V. 7. – eP. 534
177. Stams A.J., Grolle K.C., Frijters C.T., Van Lier J.B. Enrichment of thermophilic propionate-oxidizing bacteria in syntrophy with *Methanobacterium thermoautotrophicum* or *Methanobacterium thermoformicum* // Applied and Environmental Microbiology. – 1992. – V. 58. – N 1. – P. 346–352.
178. Stams A.J.M., Plugge C.M. Electron transfer in syntrophic communities of anaerobic bacteria and archaea // Nature Reviews Microbiology. – 2009. – V. 7. – N 8. – P. 568–577.
179. Stams A.J.M., Sousa D.Z., Kleerebezem R., Plugge C.M. Role of syntrophic microbial communities in high-rate methanogenic bioreactors // Water Science and Technology. – 2012. – V. 66. – N 2. – P. 352–362.
180. Stroot P.G., McMahon K.D., Mackie R.I., Raskin L. Anaerobic codigestion of municipal solid waste and biosolids under various mixing conditions — I. digester performance // Water

- Research. – 2001. – V. 35. – N 7. – P. 1804–1816.
181. Suryawanshi P.C., Chaudhari A.B., Kothari R.M. Thermophilic anaerobic digestion: the best option for waste treatment // *Critical Reviews in Biotechnology*. – 2010. – V. 30. – N 1. – P. 31–40.
182. Tajima K., Nagamine T., Matsui H., Nakamura M., Aminov R.I. Phylogenetic analysis of archaeal 16S rRNA libraries from the rumen suggests the existence of a novel group of archaea not associated with known methanogens // *FEMS Microbiology Letters*. – 2001. – V. 200. – N 1. – P. 67–72.
183. Tatusova T., DiCuccio M., Badretdin A, Chetvernin V., Ciufu S., Li W. Prokaryotic genome annotation pipeline // *The NCBI Handbook*, 2nd Ed. / Bethesda: National Center for Biotechnology Information. – 2013.
184. Thauer R.K., Kaster A.K., Seedorf H., Buckel W., Hedderich R. Methanogenic archaea: ecologically relevant differences in energy conservation // *Nature Reviews Microbiology*. – 2008. – V. 6. – N 8. – P. 579–591.
185. Tsavkelova E.A., Netrusov A.I. Biogas production from cellulose-containing substrates: a review // *Prikladnaia Biokhimiia I Mikrobiologiia*. – 2012. – V. 48. – N 5. – P. 469–483.
186. Van Lier J.B., Grolle K.C., Frijters C.T., Stams A.J., Lettinga G. Effects of acetate, propionate, and butyrate on the thermophilic anaerobic degradation of propionate by methanogenic sludge and defined cultures // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1993. – V. 59. – N 4. – P. 1003–1011.
187. Vanwonterghem I., Evans P.N., Parks D.H., Jensen P.D., Woodcroft B.J., Hugenholtz P., Tyson G.W. Methylophilic methanogenesis discovered in the archaeal phylum *Verstraetearchaeota* // *Nature Microbiology*. – 2016. – V. 1. – eP. 16170.
188. Vavilin V.A., Angelidaki I. Anaerobic degradation of solid material: importance of initiation centers for methanogenesis, mixing intensity, and 2D distributed model // *Biotechnology and Bioengineering*. – 2005. – V. 89. – N 1. – P. 113–122.
189. Vavilin V.A., Qu X., Mazéas L., Lemunier M., Duquennoi C., He P., Bouchez T. *Methanosarcina* as the dominant aceticlastic methanogens during mesophilic anaerobic digestion of putrescible waste // *Antonie van Leeuwenhoek*. – 2008. – V. 94. – N 4. – P. 593–605.
190. Venkiteshwaran K., Milferstedt K., Hamelin J., Zitomer D.H. Anaerobic digester bioaugmentation influences quasi steady state performance and microbial community // *Water Research*. – 2016. – V. 104. – P. 128–136.
191. Wagner D., Schirmack J., Ganzert L., Morozova D., Mangelsdorf K. *Methanosarcina soligelidi* sp. nov., a desiccation- and freeze-thaw-resistant methanogenic archaeon from a Siberian permafrost-affected soil // *International Journal of Systematic and Evolutionary*

- Microbiology.– 2013. – V. 63. – P. 2986–2991.
192. Wang D., Liu X., Zeng G., Zhao J., Liu Y., Wang Q., Chen F., Li X., Yang Q. Understanding the impact of cationic polyacrylamide on anaerobic digestion of waste activated sludge // *Water Research*. – 2018. – V. 130. – P. 281–290.
193. Wang F., Hidaka T., Uchida T., Tsumori J. Thermophilic anaerobic digestion of sewage sludge with high solids content // *Water Science and Technology*. – 2014. – V. 69. – N 9. – P. 1949–1955.
194. Wang X., Yang G., Feng Y., Ren G., Han X. Optimizing feeding composition and carbon-nitrogen ratios for improved methane yield during anaerobic co-digestion of dairy, chicken manure and wheat straw // *Bioresource Technology*. – 2012. – V. 120. – P. 78–83.
195. Wang Y., Zhang Y., Wang J., Meng L. Effects of volatile fatty acid concentrations on methane yield and methanogenic bacteria // *Biomass and Bioenergy*. – 2009. – V. 33. – N 5. – P. 848–853.
196. Welte C., Deppenmeier U. Bioenergetics and anaerobic respiratory chains of aceticlastic methanogens // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2014. – V. 1837. – N 7. – P. 1130–1147.
197. Westerholm M., Moestedt J., Schnürer A. Biogas production through syntrophic acetate oxidation and deliberate operating strategies for improved digester performance // *Applied Energy*. – 2016. – V. 179. – P. 124–135.
198. Westerholm M., Müller B., Singh A., Lindsjö O.K., Schnürer A. Detection of novel syntrophic acetate-oxidizing bacteria from biogas processes by continuous acetate enrichment approaches // *Microbial Biotechnology*. – 2017. – V. 11. – N 4. – P. 680 – 693.
199. Westerholm M., Roos S., Schnürer A. *Syntrophaceticus schinkii* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, syntrophic acetate-oxidizing bacterium isolated from a mesophilic anaerobic filter // *FEMS Microbiology Letters*. – 2010. – V. 309. – P. 100 – 104
200. Westerholm M., Roos S., Schnürer A. *Tepidanaerobacter acetatoxydans* sp. nov., an anaerobic, syntrophic acetate-oxidizing bacterium isolated from two ammonium-enriched mesophilic methanogenic processes // *Systematic and Applied Microbiology*. – V. 34. – N 4. – P. 260–266.
201. Win T.T., Kim H., Cho K., Song K.G., Park J. Monitoring the microbial community shift throughout the shock changes of hydraulic retention time in an anaerobic moving bed membrane bioreactor // *Bioresource Technology*. – 2016. – V. 202. – P. 125–132.
202. Wolin E.A., Wolin M.J., Wolfe R.S. Formation of methane by bacterial extracts // *J. Biol. Chem*. – 1963. – V. 238. – P. 2882–2886.
203. Wu J., Zhao P.J., Tian L., Shi L., Shi H.C., Jiang Y. [Start-up of a thermophilic anaerobic sludge digester] // *Huan Jing Ke Xue*. – 2011. –V. 32. – N 2. – P. 520–523.

204. Wu M.C., Sun K.W., Zhang Y. Influence of temperature fluctuation on thermophilic anaerobic digestion of municipal organic solid waste // *Journal of Zhejiang University Science*. – 2006. – V. 7. – N 3. – P. 180–185.
205. Xu K., Liu H., Li X., Chen J., Wang A. Typical methanogenic inhibitors can considerably alter bacterial populations and affect the interaction between fatty acid degraders and homoacetogens // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2010. – V. 87. – N 6. – P. 2267–2279.
206. Xu Y., Zhang C., Zhao M., Rong H., Zhang K., Chen Q. Comparison of bioleaching and electrokinetic remediation processes for removal of heavy metals from wastewater treatment sludge // *Chemosphere*. – 2017. – V. 168. – P. 1152–1157.
207. Yamada C., Kato S., Ueno Y., Ishii M., Igarashi Y. Conductive iron oxides accelerate thermophilic methanogenesis from acetate and propionate // *Journal of Bioscience and Bioengineering*. – 2015. – V. 119. – N 6. – P. 678–682.
208. Yang G., Zhang G., Wang H. Current state of sludge production, management, treatment and disposal in China // *Water Research*. – 2015. – V. 78. – P. 60–73.
209. Yu D., Kurola J.M., Lähde K., Kymäläinen M., Sinkkonen A., Romantschuk M. Biogas production and methanogenic archaeal community in mesophilic and thermophilic anaerobic co-digestion processes // *Journal of Environmental Management*. – 2014. – V. 143. – P. 54–60.
210. Zamanzadeh M., Parker W.J., Verastegui Y., Neufeld J.D. Biokinetics and bacterial communities of propionate oxidizing bacteria in phased anaerobic sludge digestion systems // *Water Research*. – 2013. – V. 47. – N 4. – P. 1558–1569.
211. Zavarzina D.G., Tourova T.P., Kuznetsov B.B., Bonch–Osmolovskaya E.A., Slobodkin A.I. *Thermovenabulum ferriorganovororum* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic, anaerobic, endospore-forming bacterium // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2002. – V. 52. – P. 1737–1743.
212. Zayed G., Winter J. Inhibition of methane production from whey by heavy metals—protective effect of sulfide // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2000. – V. 53. – N 6. – P. 726–731.
213. Zhai N., Zhang T., Yin D., Yang G., Wang X., Ren G., Feng Y. Effect of initial pH on anaerobic co-digestion of kitchen waste and cow manure // *Waste Management*. – 2015. – V. 38. – P. 126–131.
214. Zhang P., Zeng G., Zhang G., Li Y., Zhang B., Fan M. Anaerobic co-digestion of biosolids and organic fraction of municipal solid waste by sequencing batch process // *Fuel Processing Technology*. – 2008. – V. 89. – N 4. – P. 485–489.
215. Zheng D., Raskin L. Quantification of *Methanosaeta* species in anaerobic bioreactors using

genus- and species-specific hybridization probes // *Microbial Ecology*. – 2000. – V. 39. – N 3. – P. 246–262.