

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В.ЛОМОНОСОВА

*На правах рукописи*



**Журавлева Елена Александровна**

**Исследование прямого межвидового переноса электронов между  
синтрофными бактериями и метаногенными археями**

1.5.11. Микробиология

1.5.6. Биотехнология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва - 2024

Диссертация подготовлена на кафедре микробиологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова и в лаборатории микробиологии антропогенных мест обитания Института микробиологии им. С.Н. Виноградского ФГУ "Федеральный исследовательский центр "Фундаментальные основы биотехнологии" Российской академии наук"

**Научные руководители**

– **Котова Ирина Борисовна**, доктор биологических наук, профессор

**Литти Юрий Владимирович**, кандидат биологических наук

**Официальные оппоненты**

**Зиганин Айрат Мансурович** – доктор биологических наук, доцент, ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», Институт фундаментальной медицины и биологии, кафедра микробиологии, профессор

**Щербакова Виктория Артуровна** – доктор биологических наук, ФГБУН «ФИЦ «Пуцинский научный центр биологических исследований РАН», Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, лаборатория анаэробных микроорганизмов, заведующая лабораторией, ведущий научный сотрудник

**Гладченко Марина Анатольевна** – кандидат технических наук, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова», химический факультет, кафедра химической энзимологии, старший научный сотрудник

Защита диссертации состоится «23» апреля 2024 г. в 17 часов 00 минут на заседании диссертационного совета МГУ.015.2 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, г. Москва, ул. Ленинские горы, д. 1, стр. 12, биологический факультет, ауд. М-1.

E-mail: [nvkostina@mail.ru](mailto:nvkostina@mail.ru)

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д.27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/2927>

Автореферат разослан «21» марта 2024 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
кандидат биологических наук



Н.В. Костина

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность проблемы и степень ее разработанности

Согласно проекту государственного доклада «О состоянии и об охране окружающей среды Российской Федерации в 2022 году» за 2022 год на территории РФ образовалось 9017,3 млн т отходов производства и потребления, что превышает уровень 2021 года на 6,7%. Термическая конверсия (сжигание, пиролиз, газификация и т.д.), биологическая переработка (анаэробное сбраживание, компостирование и т.д.) и захоронение являются основными способами переработки органических отходов (Anshassi et al., 2022). Анаэробное сбраживание (АС) с конечным продуктом в виде биогаза - один из самых перспективных и экологически чистых способов переработки отходов. Метан, основной компонент биогаза, может быть использован для получения тепловой и электрической энергии. Технология АС имеет низкую стоимость с точки зрения экономической устойчивости, что делает ее еще более привлекательной для реализации на практике (Chowdhury, 2021; Meng et al., 2022).

АС органического вещества (ОВ) – это микробный процесс, включающий в себя 4 последовательные стадии: гидролиз, ацидогенез (брожение), ацетогенез и метаногенез. Гидролитическая стадия отвечает за расщепление полимеров до мономеров, таких как сахара, жирные кислоты, аминокислоты и т.д. На стадии ацидогенеза образовавшиеся мономеры сбраживаются до летучих жирных кислот (ЛЖК), спиртов, углекислого газа и молекулярного водорода. Ацетогенез, считающийся одной из лимитирующих стадий, включает синтрофное разложение ЛЖК до ацетата, водорода и  $\text{CO}_2$ , потребляемого метаногенными партнерами с образованием метана и  $\text{CO}_2$  (Meegoda et al., 2018).

К одному из факторов, препятствующих более широкому использованию технологии АС на практике, можно отнести высокие капитальные затраты на строительство анаэробных биореакторов, которые можно снизить путем интенсификации процесса, например за счет использования субстратов с высоким содержанием сухого вещества (СВ), совместного сбраживания субстратов с разным соотношением С/Н, использования термофильного режима, внесения различных добавок (Meng et al., 2022). В то же время, интенсификация процесса может привести к риску неконтролируемого накопления ЛЖК и ингибирования микроорганизмов, осуществляющих дальнейшие этапы разложения ЛЖК до метана: синтрофных бактерий и метаногенных архей, следствием чего становится значительное снижение эффективности АС, а во многих случаях и полная его остановка (Yuan, Zhu, 2016).

Исследования последних лет в области интенсификации процесса АС показали, что внесение в анаэробный биореактор различных электропроводящих материалов (ЭМ) позволяет значительно стимулировать лимитирующую стадию ацетогенеза за счет активации процесса прямого межвидового переноса электронов (DIET), который является альтернативой классическому опосредованному (через водород и формиат) переносу электронов (Gahlot et al., 2020). На поверхности ЭМ накапливаются специализированные микроорганизмы, способные

отдавать электроны ЭМ (электрогенные, например, синтрофные), а также способные принимать электроны и использовать их в своем метаболизме (электротрофные, чаще всего метаногены). В большинстве своем ЭМ (например, карбоновая ткань, гранулированный активированный уголь, магнетит, сетка из нержавеющей стали) обладают развитой поверхностью, поэтому, в том числе обеспечивают удержание активной биомассы в реакторе за счет образования биопленок (Babu, Dhar, 2017). Несмотря на многочисленные свидетельства того, что внесение ЭМ может улучшить продукцию метана на многие десятки процентов (Liu et al., 2021b), фундаментальные закономерности активации разных типов DIET, эффективности разных видов ЭМ, доминирования специфичных микробных групп в зависимости от используемого режима АС остаются недостаточно изученными. В частности, ответ электроактивного микробного сообщества на изменения нагрузки и корреляция доминирующих микробных групп с биотехнологическими параметрами процесса практически не изучены для АС в термофильном режиме. Исследованию морфологии и топологии биопленок, образующихся на поверхности ЭМ, сродству микробного сообщества к природе использованного материала также уделено недостаточно внимания. Между тем, эти знания являются крайне важными для прогнозирования стабильности, повышения эффективности и экономических показателей высокоинтенсивного процесса АС за счет внесения ЭМ. Таким образом, исследование прямого межвидового переноса электронов между синтрофными бактериями и метаногенными археями представляет значительную фундаментальную и практическую ценность.

### **Цель и задачи работы**

**Целью работы** было изучение влияния электропроводящих и инертных материалов на стимуляцию прямого межвидового переноса электронов и определение доминирующих микробных групп при анаэробном сбраживании органических отходов в термофильных условиях.

Для достижения цели работы были поставлены следующие **задачи**:

1. Изучение влияния карбонового войлока и сетки из нержавеющей стали (в сравнении с неэлектропроводящими аналогами) и метаногенного инокулята на характеристики АС низкоконцентрированного стока и смеси ЛЖК в высокой концентрации;
2. Изучение влияния электропроводящей карбоновой ткани и инертной ткани из стекловолокна на характеристики совместного АС при высокой нагрузке по ОВ;
3. Изучение влияния разных количеств ЭМ – гранулированного активированного угля (ГАУ) и магнетита, на скорость метанообразования и разложения ЛЖК при твердофазном анаэробном сбраживании (ТФ АС);
4. Изучение сукцессии микробного сообщества при АС органических отходов в термофильных условиях.

### **Научная новизна работы**

Выявлены основные группы электрогенных микроорганизмов, в том числе новые, участвующие в процессе DIET, изучена морфология и топология электроактивных биоплёнок. Впервые показана возможность стимуляции DIET в низконагруженной системе АС. Впервые выявлена активация разных типов DIET при внесении нержавеющей стали и полиэфирного войлока в систему АС в зависимости от типа инокулята и субстрата. Впервые изучено совместное сбраживание органической фракции твердых коммунальных отходов (ОФ-ТКО) с осадком сточных вод (ОСВ) в термофильном режиме в крупных лабораторных реакторах непрерывного действия с одновременной стимуляцией DIET электропроводящими материалами. Показан статистически значимый вклад карбоновой ткани в улучшение процесса совместного АС ОФ-ТКО и ОСВ при высокой нагрузке по органическому веществу. Впервые показана возможность эффективной стимуляции DIET за счет пространственного разделения субстрата и ЭМ в процессе ТФ АС ОФ-ТКО в термофильном режиме. Выявлена оптимальная дозировка магнетита и гранулированного активированного угля для ТФ АС ОФ-ТКО.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Проведенное исследование позволяет лучше понять взаимосвязи и взаимодействие микроорганизмов в метаногенном сообществе, в том числе со стимуляцией DIET на критических для процесса метаногенеза стадиях. Полученные данные могут быть использованы в учебном процессе в общих и специальных курсах по микробиологии, микробной экологии, биотехнологии. В практическом плане результаты работы могут быть использованы для оптимизации процесса АС низкоконцентрированных и высококонцентрированных стоков, отходов с высоким содержанием ЛЖК и СВ. Результаты эксперимента по совместному сбраживанию с одновременной стимуляцией DIET в больших лабораторных реакторах в перспективе позволят эффективно масштабировать технологию для промышленности.

### **Методология и методы исследования**

Автором выполнен анализ современной литературы по исследуемой теме на русском и английском языках. На основании литературных данных было проведено планирование экспериментов. В работе использовали современные методы микробиологии, молекулярной биологии, микробной биотехнологии, биоинформатики и статистики. Полученные данные были собраны, проанализированы и изложены в тексте данной работы.

### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Материал носителя, природа инокулята и субстрата существенно влияют на характеристики процесса анаэробного сбраживания органических отходов.
2. При внесении в реактор материала-носителя происходит сукцессия микробного сообщества в сторону увеличения микроорганизмов, способных к разным типам DIET.

3. Внесение электропроводящих материалов делает возможным ТФ АС органической фракции твердых коммунальных отходов в термофильном режиме.

### **Степень достоверности и апробация результатов работы**

Диссертационная работа является самостоятельным научным исследованием соискателя. Достоверность полученных результатов обусловлена значительным количеством проведенных экспериментальных исследований и статистической обработкой результатов. Достоверность результатов также подтверждается публикациями в высокорейтинговых рецензируемых международных журналах. Основные результаты работы были представлены на международных и российских конференциях и форумах: 1) Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов», Москва, Россия, 2021; 2) XXXIV Международной зимней молодёжной научной школе "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии", Россия, Москва, 2022; 3) 3rd International Conference for Bioresource Technology for Bioenergy, Bioproducts & Environmental Sustainability, Онлайн, 2021.

### **Структура работы**

Диссертационная работа состоит из следующих разделов: Введение, Обзор литературы, Результаты и обсуждение, Заключение и Выводы. Работа изложена на 156 страницах, содержит 29 рисунков, 18 таблиц. Список литературы включает 277 источников, из них 2 на русском и 275 на иностранных языках.

### **Публикации**

Материалы диссертации содержатся в 4 печатных работах. Среди них 4 статьи в рецензируемых журналах, индексируемых в базах Scopus и Web of Science, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В. Ломоносова. В статьях, опубликованных в соавторстве, основополагающий вклад принадлежит соискателю.

### **Личный вклад автора**

Автором был самостоятельно спланирован и проведен комплекс теоретических и экспериментальных исследований. Эксперименты, включающие использование крупных лабораторных анаэробных биореакторов, проводили совместно с сотрудниками ФГБНУ "Федеральный научный агроинженерный центр ВИМ" к.т.н. Ковалевым Д.А. и д.т.н. Ковалевым А.А. Автором были собраны и обработаны все полученные результаты, а также подготовлены к печати публикации.

### **Благодарности**

Автор выражает благодарность научным руководителям к.б.н. Литти Ю.В. и д.б.н. Котовой И.Б., всем сотрудникам лаборатории микробиологии антропогенных мест обитания и лаборатории биоэнергетических технологий.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Обзор литературы

Обзор литературы состоит из двух глав. Первая глава посвящена общей характеристике анаэробного разложения ОВ метаногенным микробным сообществом, приведены сведения о его биоразнообразии и функциях разных групп микроорганизмов. Рассмотрены основные стадии процесса и особенности переноса электронов у различных микробных партнеров. Во второй главе представлена классификация АС, особое внимание уделено способам интенсификации процесса АС, включая предобработку, совместное сбраживание, различные добавки и оптимизацию параметров.

### Материалы и методы исследования

#### Объекты исследования и условия экспериментов

Объектами исследования были разные типы АС (по влажности, нагрузке, режиму подачи субстрата). В эксперименте по изучению влияния карбонового войлока и сетки из нержавеющей стали (в сравнении с неэлектропроводящими аналогами) и метаногенного инокулята на характеристики АС низкоконтрированного стока и смеси ЛЖК в высокой концентрации в качестве субстратов на первом этапе использовали сток свиного комплекса (сток) и свиной навоз (навоз), на втором этапе дополнительно вносили навоз, на третьем - смесь ЛЖК (12,5 г/л). В качестве инокулятов использовали термофильно (55°C) сброженные навоз крупного рогатого скота (КРС, Ленинградская область, Россия) и осадки сточных вод (ОСВ, Череповецкий водоканал, Россия), в качестве ЭМ – карбоновый войлок (КВ) и сетку из нержавеющей стали (НС), в качестве неэлектропроводящих аналогов – полиэфирный войлок (ПВ) и сетку из стекловолокна (СС). Эксперимент проводили в стеклянных флаконах объемом 265 мл. После внесения всех компонентов флаконы тщательно продували азотом и закрывали резиновой пробкой с мешком для сбора образующегося биогаза. Флаконы инкубировали 78 суток в темноте без перемешивания при 55°C.

В эксперименте по изучению влияния электропроводящей карбоновой ткани (R3) и диэлектрической ткани из стекловолокна (R2) на характеристики совместного АС при высокой нагрузке по ОВ в качестве субстрата использовали смесь ОСВ и органической фракции твердых коммунальных отходов (ОФ-ТКО). Эксперимент проводили в биореакторах непрерывного действия объемом 90 л (Рисунок 1а) с постепенным повышением нагрузки с 2,4 до 12,12 кг ОВ/(м<sup>3</sup> сутки) при 55°C в течение 71 суток. Контрольный реактор (R1) носителей не содержал.

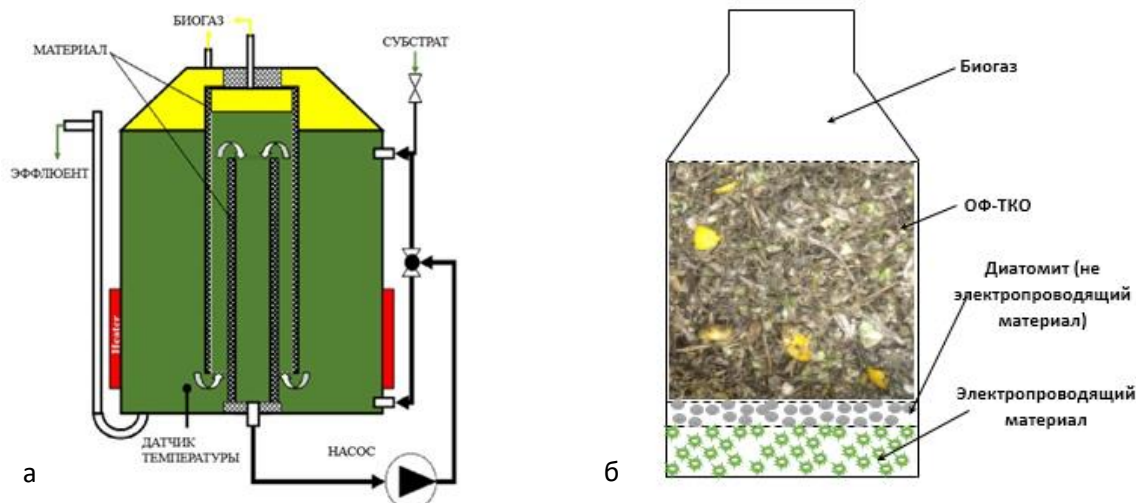


Рисунок 1. Схема одного из 3-х анаэробных биореакторов объемом 90 л (а) и принципиальная схема (б) экспериментальной установки по ТФ АС ОФ-ТКО.

В эксперименте по изучению влияния разных дозировок ЭМ - гранулированного активированного угля (ГАУ) и магнетита (Маг) на скорость метанообразования и разложения ЛЖК при твердофазном АС (ТФ АС) в качестве субстрата использовали модельную смесь ОФ-ТКО, а в качестве инокулята – термофильно (52°C) сброженный навоз КРС, обогащенный синтрофными и электроактивными микроорганизмами за счет прединкубации со смесью ЛЖК в концентрации 40 мМ, с добавлением ГАУ или Маг. В соответствии с принципиальной схемой установки (Рисунок 1б), в биореактор вносили сперва слой ГАУ или Маг, далее разделительный слой диатомита и в конце слой ОФ-ТКО с инокулятом. Флаконы инкубировали в темноте без перемешивания при 52°C 43 дня. Контроли не содержали ЭМ и диатомит (К1), либо содержали только слой диатомита (К2).

### Определение кинетических параметров метаногенеза

Кинетические параметры метаногенеза определяли с помощью модифицированного уравнения Гомперца и уравнения первого порядка. Расчет кинетических параметров проводили в программе MS-Excel с помощью надстройки Solver.

### Аналитические методы

Анализ газовой (водород, углекислый газ, метан) и жидкой (этанол и ЛЖК) фазы проводили на газо-жидкостном хроматографе Кристалл 5000.2 (Хроматек, Россия). pH измеряли с помощью pH-метра FE20, оснащенного микроэлектродом InLab® (оба Mettler Toledo, Швейцария). Элементный состав CHNS(O) определяли с использованием элементного анализатора Elementar Vario EL cube (Elementar Analysensysteme GmbH, Германия). Удельную поверхность материалов оценивали методом BET. Для определения содержания СВ, ОВ, белков, жиров и клетчатки использовали стандартные методы (АОАС, 2000). Химическое потребление кислорода (ХПК) определяли на спектрофотометре DR5000 с использованием



куветного теста LCK 514 (Nach Lange GmbH, Германия). Концентрацию  $\text{NH}_4^+$  измеряли с использованием системы капиллярного электрофореза Капель-205 (Люмэкс, Россия).

### **Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ)**

Образцы биопленок дважды промывали фосфатным буфером (pH 7,0) и обезвоживали в растворах этилового спирта возрастающей концентрации (от 15 до 100%). Затем образцы дважды промывали 100%-м ацетоном и сушили в критической точке с помощью специальной камеры. Высушенные препараты устанавливали на специальные столы, а затем на препараты напыляли тонкий слой металла (золото/палладий) для создания токопроводящего покрытия. Полученные образцы исследовали с помощью сканирующего электронного микроскопа TM3000 (Hitachi, Япония) (ускоряющее напряжение 15 кВ).

### **Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия (КЛСМ)**

К промытым фосфатно-солевым буфером образцам биопленок добавляли лектин ConA, конъюгированный с флуоресцентным красителем Alexa Fluor 488 (C11252 ThermoFisher) в фосфатном буфере с разведением 1:500, связывающийся с моносахаридами клеточных стенок микроорганизмов и экзополисахаридами, и флуоресцентный краситель SYBR Green II, разведенный в фосфатном буфере 1:1000, связывающийся с нуклеиновыми кислотами (НК) (преимущественно с РНК). Образцы анализировали с помощью конфокального микроскопа Zeiss LSM880 (Zeiss, Германия).

### **Секвенирование ДНК**

ДНК из образцов была выделена с использованием коммерческих наборов DNeasy PowerLyzer Microbial Kit (Cat. 12255-50, Qiagen, Германия) в соответствии с инструкцией производителя. Далее из полученных препаратов тотальной ДНК микробных сообществ была осуществлена амплификация V4 участка гена 16S рРНК путем полимеразной цепной реакции (ПЦР), приготовление библиотек фрагментов осуществлялось путем амплификации согласно методике (Fadrosh et al., 2014). Подготовленные для секвенирования ампликоны, имеющие праймеры технических последовательностей на 5'-концах, секвенировали согласно стандартному протоколу Illumina Sample Preparation Guide на платформе MiSeq (Gohl et al., 2016). Полученные ОТЕ идентифицировали и привязывали к определенным таксонам микроорганизмов на основании баз данных Silva (<https://ngs.arb-silva.de/silvangs/>). Относительное количество прочтений, входящих в ту или иную ОТЕ, соответствует относительной представленности данного таксона микроорганизмов в исследуемом микробном сообществе (Caporaso et al., 2010; Quast et al., 2013).

### **Статистические и биоинформатические методы**

Для обработки результатов исследования использовали стандартные библиотеки для анализа и визуализации данных на языке Python и R. Проверка статистических гипотез осуществлялась на базе библиотеки SciPy. Для проверки статистической гипотезы о значимых различиях между реакторами использовали критерий Краскела-Уоллиса (H-test), а затем U-

критерий Манна-Уитни в качестве post-hoc теста с поправкой Сидака на множественные сравнения. Статистическую обработку и графическую визуализацию полученных результатов также проводили в программе Microsoft Excel 2013 и OriginPro 2022 v.9.9.0.225. Уровень значимости  $\alpha$  принят за 0,05.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Влияние карбонового войлока и сетки из нержавеющей стали (в сравнении с неэлектропроводящими аналогами) и метаногенного инокулята на характеристики анаэробного сбраживания низкоконцентрированного стока и смеси летучих жирных кислот в высокой концентрации**

Целью данного эксперимента было показать возможность улучшения метаногенеза в низко- и высококонцентрированной системе АС за счет стимуляции DIET.

### **Образование метана, кинетические параметры метаногенеза**

На первом этапе эксперимента при использовании ОСВ в качестве инокулята было отмечено позитивное влияние полиэфирного (ОСВ-ПВ) и карбонового (ОСВ-КВ) войлоков на динамику накопления метана. Разница между ними была незначительной, кумулятивный выход метана в конце первого этапа составлял 805,0 и 793,4 мл, соответственно (Рисунок 2а). Во флаконах с КРС в качестве инокулята наибольшее количество метана образовалось с носителем в виде сетки из стекловолокна (КРС-СС), объём накопленного метана составил 961,9 мл (Рисунок 2б). На втором этапе эксперимента с ОСВ в качестве инокулята наибольшее количество метана (1446,4 мл) наблюдалось во флаконах с полиэфирным войлоком (ОСВ-ПВ, Рисунок 2в), аналогично первому этапу. В то же время при применении карбонового войлока (ОСВ-КВ) количество накопленного метана было меньше и составляло 1152,2 мл (Рисунок 2в). При использовании КРС в качестве инокулята, больше всего метана образовалось во флаконах с нержавеющей сталью (КРС-НС) – 1412,1 мл, причем это значение было значительно выше, чем 1204,7 мл  $\text{CH}_4$  во флаконах с сеткой из стекловолокна (КРС-СС, Рисунок 2г). В ходе третьего этапа эксперимента во флаконах с ОСВ в качестве инокулята отмечалось позитивное влияние карбонового войлока (ОСВ-КВ) и сетки из нержавеющей стали (ОСВ-НС) на динамику накопления метана (Рисунок 2 д). Общий объём накопленного метана составил для ОСВ-КВ - 401,6 и 413,9 мл - для ОСВ-НС, что на 27,2% и 31,1% больше в сравнении с ОСВ-К (315,8 мл  $\text{CH}_4$ ). Во флаконах с КРС в качестве инокулята наибольшее количество метана образовалось с носителем в виде полиэфирного войлока (КРС-ПВ), сеткой из нержавеющей стали (КРС-НС) и сеткой из стекловолокна (КРС-СС), суммарный выход метана в конце эксперимента составил 791,6 мл, 730,4 мл и 726,9 мл  $\text{CH}_4$ , соответственно, что на 46,7%, 35,4% и 34,7% больше по сравнению с контролем КРС-К - 539,6 мл (Рисунок 2 е).

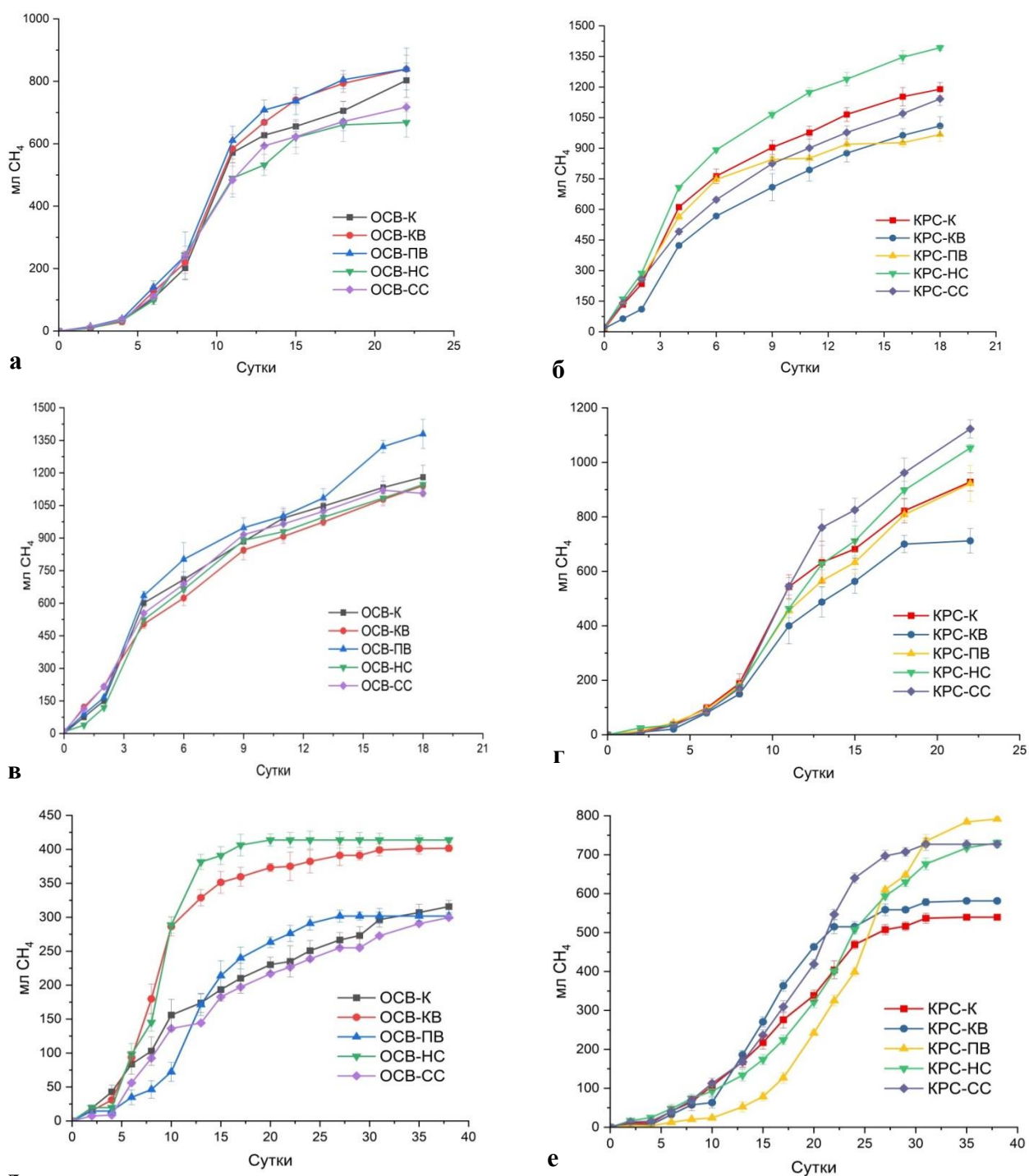


Рисунок 2. Динамика образования метана при АС комплексного отхода свинофермы и смеси ЛЖК с ОСВ и КРС в качестве инокулята на первом (а, б) и втором (в, г) и третьем (д, е) этапах эксперимента.

Анализ избыточности (RDA) был использован для количественной оценки относительного вклада комбинаций материала/инокулята в кинетические параметры АС на втором и третьем этапах эксперимента (Рисунок 3). На втором этапе эксперимента наблюдалась положительная корреляция ОСВ-ПВ с  $\gamma$  и отрицательная с  $\lambda$ , а у КРС-НС наблюдалась положительная корреляция с  $K$  и отрицательная с  $\lambda$  (Рисунок 3 а). На третьем этапе

эксперимента наблюдалась положительная корреляция ОСВ-КВ и ОСВ-НС с  $K$  и  $\gamma$ , а у КРС-ПВ с  $\lambda$  (Рисунок 3 б).

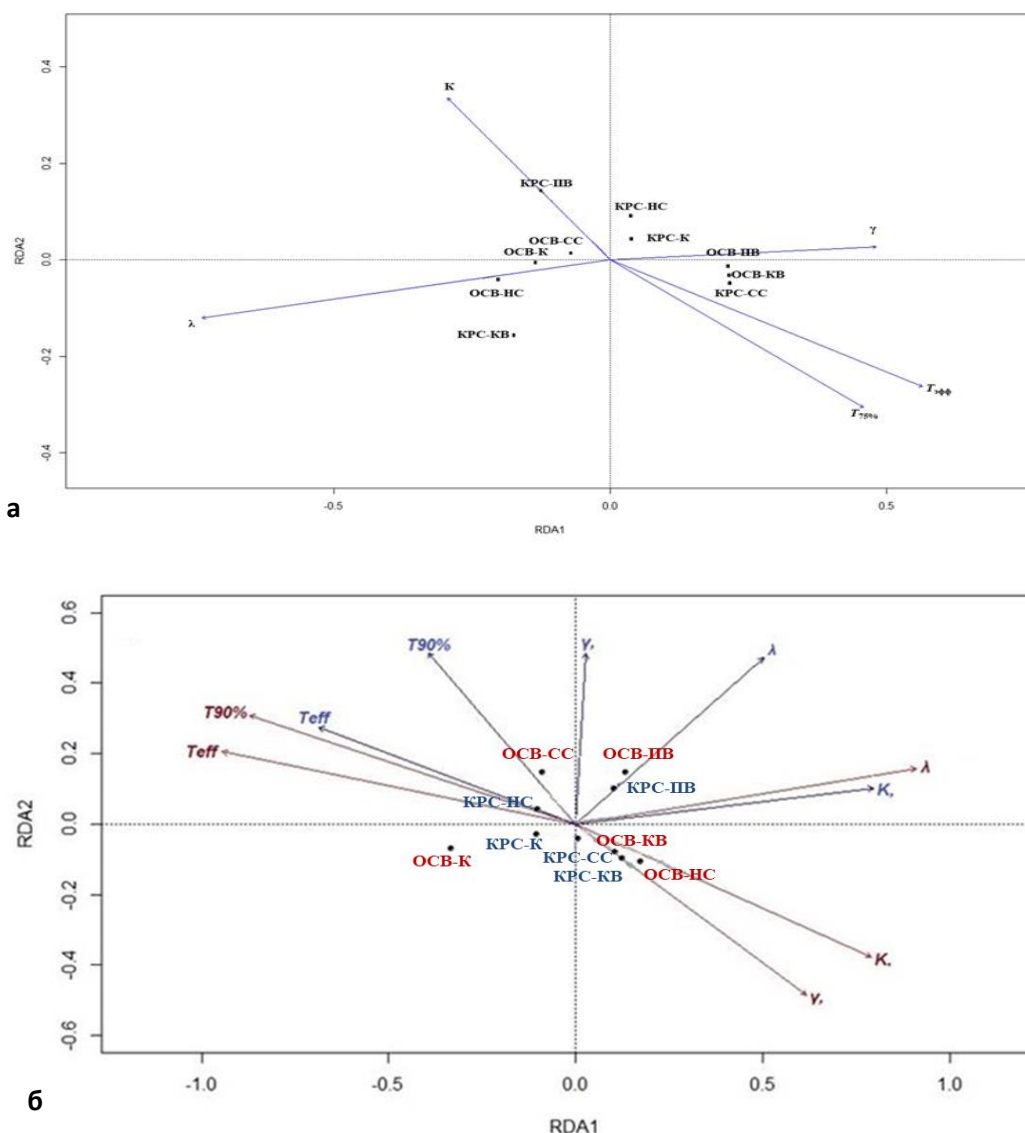


Рисунок 3. Анализ избыточности (RDA), показывающий взаимосвязь между комбинациями инокулята/материала и кинетическими параметрами АС на втором (а) и третьем (б) этапах эксперимента. ОСВ-К, ОСВ-КВ, ОСВ-ПВ, ОСВ-НС, ОСВ-СС, КРС-К, КРС-КВ, КРС-ПВ, КРС-НС, КРС-СС - основные компоненты комбинаций инокулята/материала и  $K$ ,  $\lambda$ ,  $T_{75\%}$ ,  $T_{эфф}$ ,  $\gamma$  – основные кинетические параметры АС, рассматриваемые в данном исследовании.

#### Динамика образования и потребления ЛЖК, удаление органического вещества

Помимо динамики и кинетических параметров метаногенеза, влияние электропроводящих и инертных материалов на процесс АС оценивали по степени разложения ЛЖК ( $XPK_{ЛЖК}$ ), растворенного ( $XPK_{раств}$ ) и ОВ.

На первом этапе эксперимента наиболее высокая степень разложения  $XPK_{раств}$  наблюдалась в ОСВ-ПВ (32%), КРС-ПВ (37%), КРС-НС (37%); ОВ – в ОСВ-К (31%), ОСВ-НС (30%), ОСВ-СС (31%), КРС-КВ (31%) и КРС-НС (30%). На втором этапе степень разложения

ХПК<sub>раств.</sub> была выше в ОСВ-НС (42%), КРС-К (45%), КРС-НС (43%) и КРС-СС (44%); ОВ лучше разлагалось в ОСВ-НС (36%) и КРС-НС (40%). На третьем этапе эксперимента степень удаления ХПК<sub>лжк</sub> к концу эксперимента (40 сутки) составила 76% для ОСВ-КВ и ОСВ-НС и 74% для ОСВ-К. Для флаконов с КРС степень удаления ХПК<sub>лжк</sub> к концу эксперимента (40 сутки) составила 88% для КРС-ПВ и 86% для КРС-К и оставшихся флаконов. Таким образом, внесение материалов увеличивало скорость потребления ОВ и ХПК, но не абсолютные значения их удаления к концу эксперимента.

На первом этапе эксперимента скорость потребления ЛЖК, в целом, была выше при использовании КРС в качестве инокулята; в КРС-К и КРС-НС к 14-м суткам происходило полное разложение ацетата, а к 18-м суткам – пропионата и бутирата. При использовании ОСВ в качестве инокулята полное разложение ацетата в ОСВ-НС регистрировали к 10-м суткам, а в ОСВ-К, ОСВ-ПВ, ОСВ-КВ и ОСВ-СС – к 14-м суткам; разложение пропионата шло медленно, и только в ОСВ-НС к 14-м суткам наблюдали заметное снижение его концентрации. На втором этапе эксперимента разложение пропионата и ацетата быстрее всего проходило в ОСВ-НС и ОСВ-СС (к 10-м суткам), тогда как в ОСВ-К наиболее медленно – к 14-м суткам. При использовании КРС в качестве инокулята разложение ацетата и пропионата быстрее всего (к 10-м суткам) происходило в КРС-КВ и КРС-К, у остальных флаконов - к 14-м суткам. В начале третьего этапа эксперимента концентрации ацетата, пропионата и бутирата были равны 121 мМ, 49 мМ и 20,5 мМ во всех флаконах. К 40 суткам концентрации ацетата, пропионата и бутирата составили 19 мМ, 18 мМ и 4 мМ для ОСВ-КВ и ОСВ-НС, а для ОСВ-К - 21 мМ, 18 мМ и 3 мМ. Во флаконах с КРС разложение ЛЖК к концу эксперимента было равномерным, концентрации ацетата, пропионата и бутирата составили 3 мМ, 17,8 мМ и 1 мМ. Фактически на третьем этапе наиболее эффективно процесс разложения ЛЖК шел в ОСВ-КВ, ОСВ-НС и КРС-ПВ. В целом, можно отметить, что скорость удаления ОВ, ЛЖК и снижения ХПК коррелировала с продукцией метана.

### **Особенности морфологии биопленок на поверхности материалов**

При использовании ОСВ в качестве инокулята биообрастание на поверхности НС и СС происходило достаточно интенсивно. К концу первого этапа эксперимента биопленками визуально была покрыта третья часть поверхности материалов, а на втором и третьем этапах эксперимента – практически вся. Биопленки, образовавшиеся на поверхности НС и СС, были представлены в основном клетками размером 1-3 мкм с разной морфологией. Биопленки в ОСВ-НС были представлены бóльшим процентом мелких и крупных округлых клеток, а также более плотным полисахаридным матриксом, а в ОСВ-СС имели более рыхлую текстуру (Рисунок 4 а, б). Биообрастание двух типов войлоков с применением ОСВ в качестве инокулята отличалось между собой. Для КВ было свойственно образование очень плотного матрикса, заполняющего всё пространство в гуще волокон, биопленка на инертном ПВ располагалась по всей поверхности волокон. Для КВ с КРС в качестве инокулята было свойственно образование

плотного матрикса, заполняющего всё пространство в гуще волокон, а для полиэфирного войлока – образование более рыхлых структур, расположенных по всей поверхности волокон. Структура обрастания была аналогична обрастаниям с использованием ОСВ в качестве инокулята.

Интересно отметить, что во всех флаконах на всех материалах носителях при использовании ОСВ и КРС в качестве инокулятов были обнаружены пилеподобные структуры.

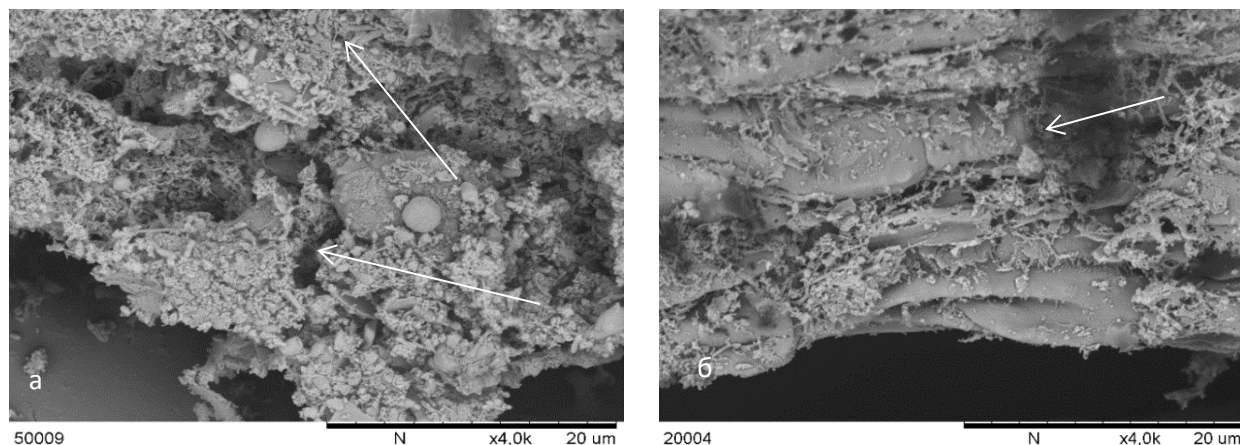


Рисунок 4. СЭМ-изображения, показывающие образование локальных биопленок на поверхности сетки из нержавеющей стали (ОСВ-НС) (а), сетки из стекловолокна (ОСВ-СС) (б), стрелками отмечены пилеподобные структуры.

Согласно данным конфокальной микроскопии, обрастание КРС-КВ шло преимущественно единичными или сгруппированными в небольшие колонии клетками, формирование биопленок происходило в межслое материала или вдоль волокна. Обрастание полиэфирного войлока шло вдоль волокна, клетки были рассеяны в матриксе биопленки, покрытие экзополисахаридами (ЭПС) достигало 85,7%. Расчёты показали, что биопленка развивалась эффективнее на поверхности полиэфирного войлока в сравнении с карбоновым.

#### **Анализ микробного сообщества**

К концу третьего этапа эксперимента в биопленках на всех материалах доминировали гидрогенотрофные археи рода *Methanothermobacter* для обоих инокулятов. В бактериальном компоненте сообщества с ОСВ в качестве инокулята основными доминирующими группами во всех флаконах (за исключением ОСВ-НС) на втором этапе эксперимента были представители рода *Coprothermobacter* и группы *Clostridium sensu stricto 1*. В значительно меньшем количестве во всех флаконах, исключая ОСВ-НС, содержались представители родов *Terrisporobacter*, *Turicibacter*, *Romboutsia*, *Acetomicrobium*, *Candidatus Caldatribacterium*, причем в ОСВ-К содержание *Candidatus Caldatribacterium* было довольно высоким. В ОСВ-НС основными доминирующими родами были *Bacillus*, *Ureibacillus*, *Hydrogenispora* и *Coprothermobacter*; в меньшей степени присутствовали *Simplicispira*, *Anaerobacillus*, *Psychrobacter*, *Limnochordia uncultured* и *Halocella*, которые в ОСВ-К и в биопленках на других материалах практически полностью отсутствовали. В бактериальной части сообщества с использованием КРС в качестве

инокулята во всех флаконах на втором этапе эксперимента доминировала группа МВА03, относящаяся к классу *Limnochordia*, сам класс *Limnochordia* и некультивируемые представители, а также представители родов *Hydrogenispora* и *Ruminiclostridium*. На третьем этапе эксперимента во флаконах с ОСВ в качестве инокулята основные доминирующие группы в планктонной и прикрепленной формах были представлены родами *Coprothermobacter*, *Candidatus Caldatribacterium*, *Hydrogenispora*, классом *Limnochordia* и группой *Limnochordia МВА03*. Во всех флаконах было равномерное распределение доминирующих и минорных групп, однако в биопленках во флаконах ОСВ-НС доминировали представители рода *Ureibacillus*, а в ОСВ-СС - рода *Bacillus*. На третьем этапе эксперимента для флаконов с КРС основные доминирующие представители сохранялись - род *Hydrogenispora*, класс *Limnochordia* и группа *МВА03* класса *Limnochordia* и в планктонной, и в прикрепленной формах. Микроорганизмы рода *Hydrogenispora* в жидкой фазе были более многочисленны, в сравнении с биопленками. Бактерии родов *Hungateiclostridium*, *Ruminiclostridium*, *Syntrophaceticus*, *Halocella*, а также групп *D8A-2* и *DTU014* содержались во всех флаконах в существенно меньшем количестве. Во всех флаконах было равномерное распределение доминирующих и минорных групп, аналогично флаконам с ОСВ, однако в КРС-НС и КРС-СС наблюдалось высокое содержание прикрепленных микроорганизмов рода *Ureibacillus*.

Для флаконов с ОСВ вклад процесса ДИЕТ в метаногенез на втором этапе эксперимента может осуществляться представителями наиболее многочисленных групп *Coprothermobacter* и *Clostridium sensu stricto 1*, а на третьем – представителями родов *Ureibacillus*, *Coprothermobacter*, *Candidatus Caldatribacterium* и представителями класса *Limnochordia*, предположительно участвующих в синтрофном процессе (Xiao et al., 2019; Gahlot et al., 2020). Основу сообщества флаконов с КРС на втором и третьем этапах эксперимента составляла интересная группа микроорганизмов *МВА03*, класса *Limnochordia*, которые, вероятно, могут осуществлять синтрофный метаболизм. Вероятно, во флаконах и с ОСВ, и с КРС произошла стимуляция процесса синтрофного окисления ацетата (САО), так как при относительно высоком содержании ацетатпродуцирующих микроорганизмов, количество ацетокластических метаногенов было значительно ниже, чем гидрогенотрофных (Dyksma et al., 2020).

Несмотря на то, что исследования по вкладу процесса ДИЕТ в улучшение характеристик АС в основном относятся к высоконагруженным системам, в нашей работе было показано, что при анаэробной переработке относительно низкоконцентрированных субстратов также возможна активизация процесса ДИЕТ, выражающаяся в небольшом улучшении параметров сбраживания, увеличении выхода метана и общей стабилизации процесса. В то же время, стимуляция ДИЕТ за счет внесения ЭМ и накопления специфичных электроактивных групп в высоконагруженной системе АС (на примере высококонцентрированной смеси ЛЖК в качестве субстрата) повышает общую стабильность системы и значительно улучшает параметры АС.

## Влияние электропроводящей карбоновой ткани и инертной ткани из стекловолокна на характеристики анаэробного сбраживания при высокой нагрузке по органическому веществу

После подтверждения способности DIET к улучшению метаногенеза в периодической низконагруженной системе АС в следующем эксперименте было изучено влияние электропроводящего материала в проточной системе АС с постепенным увеличением нагрузки с низкой до высокой.

### Образование метана и биогаза

Увеличение нагрузки по ОВ сопровождалось пропорциональным увеличением скорости образования биогаза и метана. Согласно U-критерию Манна - Уитни в качестве post-hoc теста с поправкой Сидака на множественные сравнения, статистически достоверными были различия в выходе биогаза между реакторами R1 (контроль), R2 (стекловолокно) и R3 (карбоновая ткань) на всех стадиях процесса, а между R2 и R3 - только при нагрузке 12,12 кг ОВ/(м<sup>3</sup> сутки) (Рисунок 5).

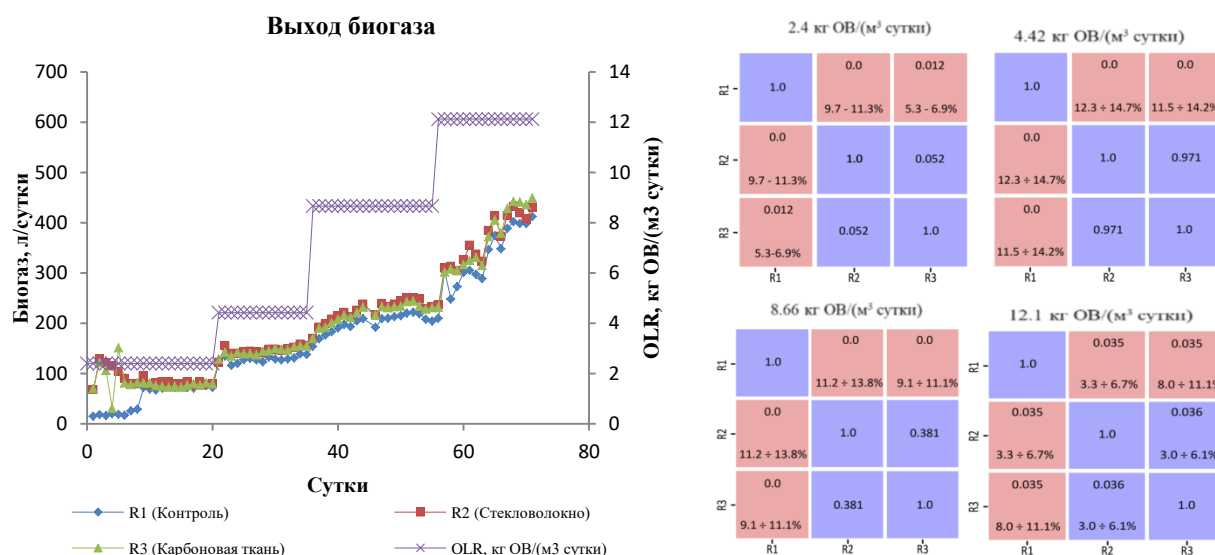


Рисунок 5. Динамика образования биогаза и статистически значимые различия реакторов R1, R2 и R3. N-test и U-критерий Манна - Уитни в качестве post-hoc теста с поправкой Сидака для нагрузки 2,4; 4,42; 8,66; и 12,12 кг ОВ/(м<sup>3</sup> сутки). Для реакторов, значимо отличающихся друг от друга (красные квадраты), наряду с р-значениями представлены медианные достоверительные интервалы различий в абсолютной, а также в относительной величинах.

Так, при нагрузке 2,4 кг ОВ/(м<sup>3</sup> сутки) выход биогаза у реакторов R2 и R3 выше, чем у R1, на 9,94% и 5,9%; при нагрузке 4,42 кг ОВ/(м<sup>3</sup> сутки) - на 12,16% и 11,5%; при нагрузке 8,66 кг ОВ/(м<sup>3</sup> сутки) - на 11,15% и 8,97%, а при нагрузке 12,12 кг ОВ/(м<sup>3</sup> сутки) - на 4,95% и 8,97%, соответственно. При нагрузке 12,12 кг ОВ/(м<sup>3</sup> сутки) статистически достоверна разница между реакторами R2 и R3, где выход биогаза у R3 выше на 4,24% (Рисунок 5).



## Динамика образования и потребления ЛЖК, удаление органического вещества, изменение рН

При переходе биореакторов на максимальную нагрузку 12,12 кг ОВ/(м<sup>3</sup> сутки), степень удаления органического вещества в эффлюенте падала с 67-70% до 56±1% (Таблица 1) для всех реакторов, однако ожидаемого закисления сброживаемой массы не наблюдали. Накопление ЛЖК было самым низким для R3 на всех стадиях процесса, кроме третьей, с нагрузкой 8,66 кг ОВ/(м<sup>3</sup> сутки), однако на четвертой стадии с нагрузкой 12,12 кг ОВ/(м<sup>3</sup> сутки) общая концентрация ЛЖК для R3 была ниже на 45% и 12%, чем для R1 и R2. Добавление материала носителя, особенно электропроводящей карбоновой ткани, стабилизировало процессы, в том числе поддерживая более высокий рН.

Таблица 1. Характеристики процесса метаногенного сброживания в анаэробных биореакторах.

Параметры АС	Реактор	OLR, кг ОВ/(м <sup>3</sup> сутки)			
		2,4	4,42	8,66	12,12
Степень удаления ОВ, %	R1	52,9±6,6	57,2±5,3	67,3±1,6	56,7±6,7
	R2	57,1±7,4	55,4±4,8	68,2±1,6	56,1±2,0
	R3	51,3±11,4	58,6±4,0	69,6±1,1	56,6±3,4
ЛЖК <sub>конечн</sub> , г/л	R1	0,69± 0,31	0,98±0,14	0,83±0,20	1,57±0,62
	R2	0,63±0,38	0,90±0,11	0,49±0,22	0,98±0,16
	R3	0,60±0,24	0,77±0,15	0,50±0,21	0,87±0,20
рН	R1	6,73±0,16	6,96±0,16	6,55±0,08	6,62±0,15
	R2	6,62±0,09	6,98±0,07	6,78±0,19	6,86±0,22
	R3	6,59±0,08	7,03±0,06	6,75±0,13	6,91±0,21

### Анализ микробного сообщества

Во всех реакторах в планктонной форме микробного сообщества происходила смена ацетокластического типа метаногенеза на гидрогенотрофный за счет доминирования рода *Methanothermobacter* и снижения численности *Methanotrrix* (Рисунок 6). В бактериальном компоненте планктонного микробного сообщества всех реакторов основными доминирующими родами были *Anaerobaculum*, *Coprothermobacter*, *Clostridium III*, *Defluviitoga* и *Fervidobacterium* (Рисунок 6). Микробное сообщество биопленок на карбоновой ткани и стекловолокне содержало бактерии родов *Anaerobaculum* и *Coprothermobacter*, способных к протеолизу и синтрофии. Существенным отличием между биопленками было то, что в микробном сообществе на карбоновой ткани присутствовало большое количество микроорганизмов рода *Defluviitoga*, способных к ДИЕТ совместно с *Methanotrrix*, который был доминирующим метаногеном среди прикрепленных форм. Микроорганизмы рода *Theridanaerobacter*,

содержащиеся в биопленке реактора R3, способны к синтрофному окислению ацетата (Westerholm et al., 2011).

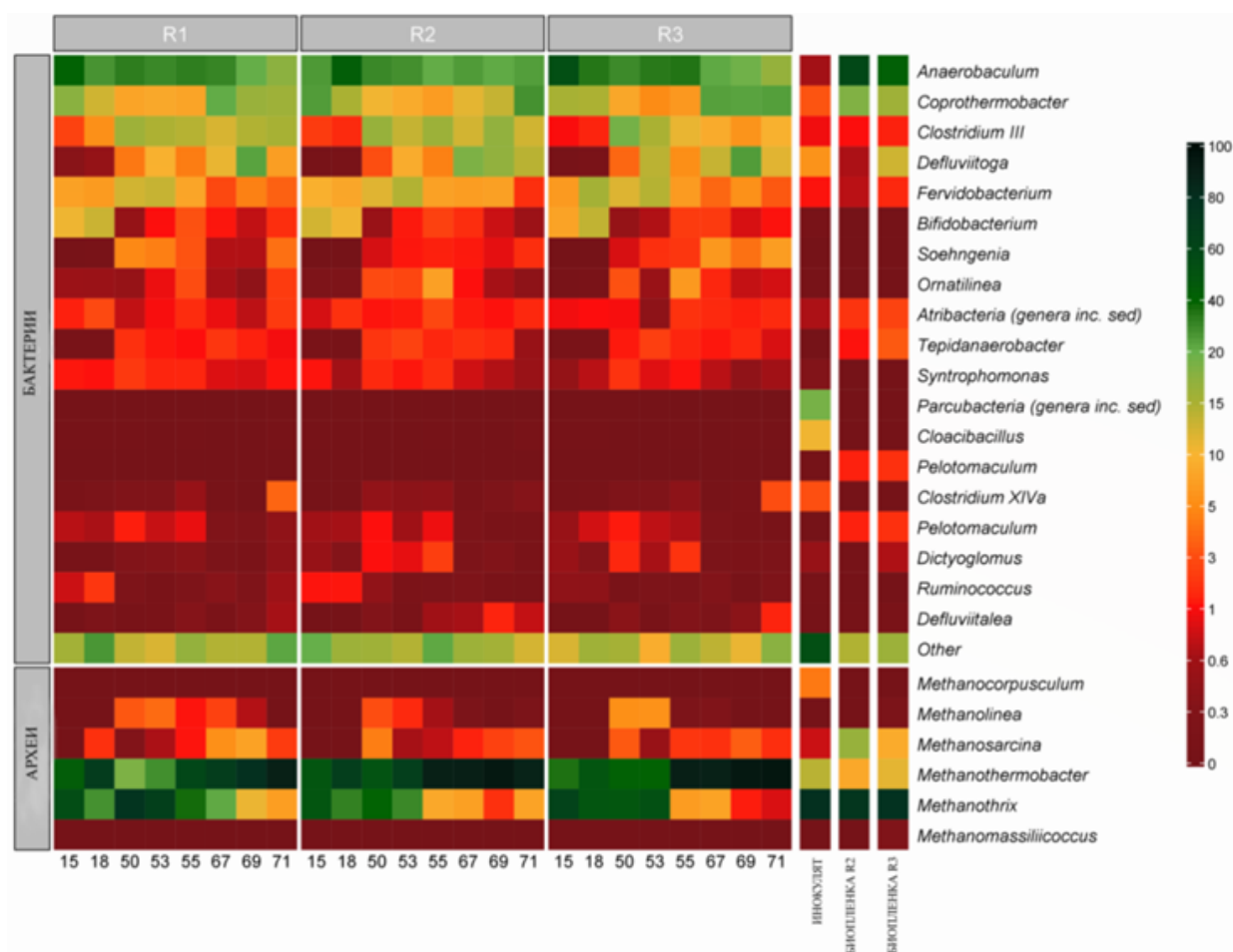


Рисунок 6. Тепловая карта динамики изменения профиля микробного сообщества на уровне родов в ходе эксперимента на основании сиквенса гена 16S рНК для планктонных и прикрепленных форм.

### Корреляционный анализ

Нами была проанализирована корреляция между переменными, сгруппированными по значениям для выявления скрытых закономерностей, где статистически незначимые значения отмечены серым крестиком (уровень значимости равен 0,05). Содержание бактерий родов *Bifidobacterium*, *Fervidobacterium* и *Anaerobaculum* негативно коррелировало с повышением OLR и показало достоверную ( $p < 0,05$ ) отрицательную корреляцию с основными параметрами АС, такими как выход биогаза и метана, содержание метана в биогазе. Численность микроорганизмов рода *Methanotherix* статистически значимо положительно коррелировала с HRT и негативно с OLR и основными параметрами АС, такими как выход биогаза и метана и содержание метана в биогазе, а также с микроорганизмами рода *Methanothermobacter*. Представители группы *Clostridium III* положительно и статистически значимо коррелируют с OLR и соотношением ОФ-ТКО/ОСВ, что соответствует литературным данным (Nguyen et al., 2018).

Анализ комплекса статистически значимых биотехнологических и микробиологических параметров показал, что добавление карбоновой ткани положительно сказывается на процессе анаэробного сбраживания, особенно при высоких нагрузках по органическому веществу (12,12 кг ОВ/(м<sup>3</sup> сутки)). Биопленка на карбоновой ткани была обогащена микроорганизмами рода *Defluviitoga*, способными к DIET, что объясняет улучшение характеристик АС. Выявленные корреляции между биотехнологическими параметрами и состоянием микробного сообщества помогут стабилизировать и сделать более эффективным процесс АС.

### Влияние разных количеств электропроводящего материала - гранулированного активированного угля (ГАУ) и магнетита (Маг) на скорость разложения ЛЖК и метанообразования при твердофазном анаэробном сбраживании

Для исследования возможности улучшения ТФ АС в термофильных условиях за счет стимуляции DIET впервые исследована новая система с пространственным разделением фаз ЭМ и сбраживаемого субстрата (Рисунок 1б).

#### Образование метана, кинетические параметры метаногенеза

Внесение электропроводящих материалов существенно улучшило характеристики ТФ АС модельной ОФ-ТКО. Наибольший выход метана наблюдался во флаконах с добавлением 20 г на флакон ГАУ - 267 мл СН<sub>4</sub>/г ОВ и во флаконах с 10 г на флакон Маг –286 мл СН<sub>4</sub>/г ОВ (Рисунок 7). Чуть ниже выход метана был при добавлении ГАУ и Маг в количестве 10 и 20 г, он составил 261 и 281 мл СН<sub>4</sub>/г ОВ, соответственно. В обоих контрольных флаконах образование метана практически полностью останавливалось на 4-8 сутки эксперимента. В К2, содержащем диатомит, суммарный выход метана составил 14,86 мл СН<sub>4</sub>/г ОВ, а в К1 - всего 1,59 мл СН<sub>4</sub>/г ОВ. Содержание метана в биогазе флаконов, содержащих слой электропроводящего материала, после 5-х суток эксперимента составляло в среднем 63%, в К2 на 4 сутки содержание метана в биогазе составило 44% и затем постепенно снизилось до 4,5%, в К1 на 12 сутки содержание метана составило 10% и в ходе эксперимента не поднималось выше 1,5% (Рисунок 7).

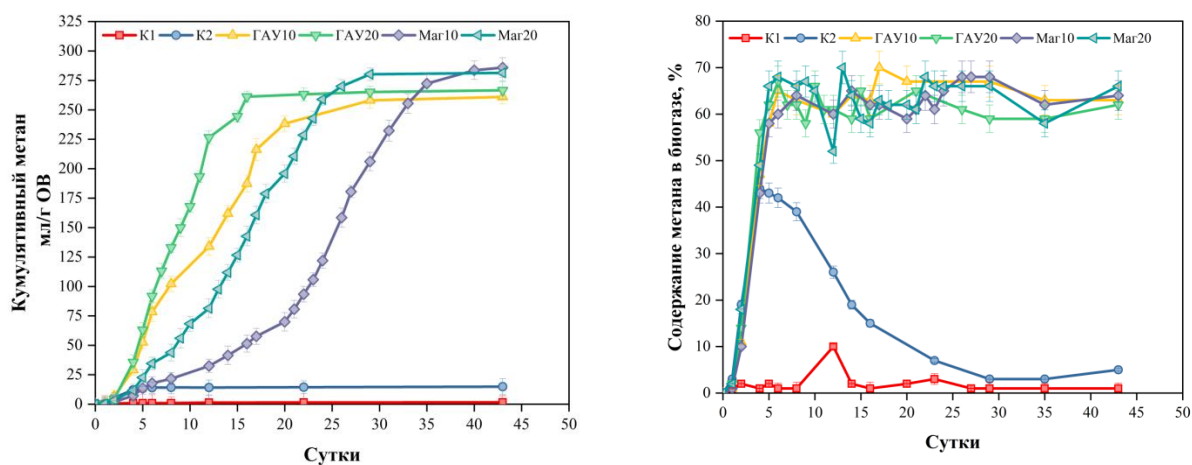


Рисунок 7. Динамика образования метана и содержания метана в биогазе при ТФ АС ОФ-ТКО.

Процессы гидролиза и кислотогенеза в первые 4-7 суток сопровождались накоплением значительного количества водорода, суммарный объем был наибольшим во флаконе К1- 21,98 мл  $H_2$ /г ОВ. В остальных флаконах накопление водорода прекратилось уже на 4 сутки, общий объем накопленного водорода составил  $9,08 \pm 1,98$  мл  $H_2$ /г ОВ.

График RDA показывает связь ЭМ с кинетическими параметрами метаногенеза (Рисунок 8). К и  $\gamma$  имели положительную корреляцию с ГАУ10 и ГАУ20, а  $\lambda$ , T90 % и Tэфф положительно коррелировали с Маг10 и Маг20. Таким образом, внесение ГАУ в первую очередь положительно влияет на максимальную скорость процесса и потенциальный выход метана, а внесение Маг снижает лаг-фазу процесса.

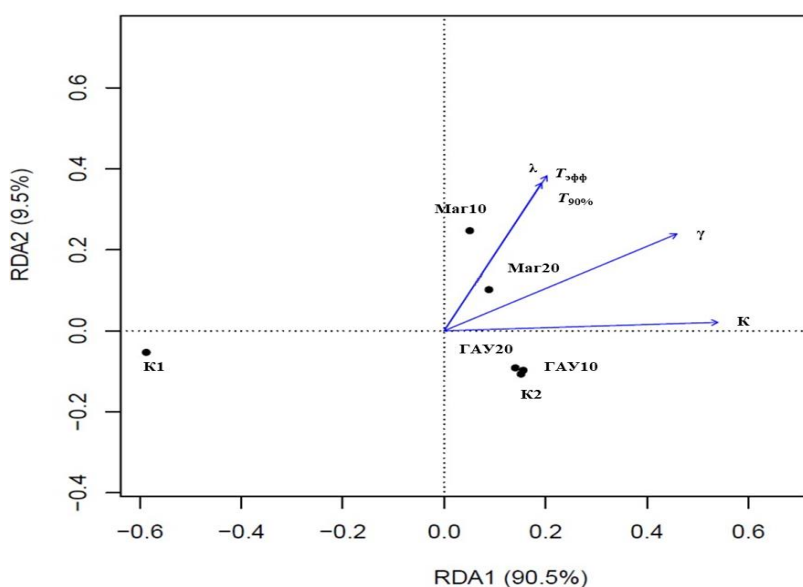


Рисунок 8. Анализ избыточности (RDA), показывающий взаимосвязь между флаконами и кинетическими параметрами АС. К,  $\lambda$ , T90%, Tэфф,  $\gamma$  – основные компоненты кинетических параметров АС.

#### Динамика образования и потребления ЛЖК, удаления органического вещества, рН

Во флаконах с Маг наблюдались различия по сравнению с флаконами серии ГАУ. Так при добавлении ГАУ в количестве 10 и 20 г на флакон максимальная концентрация ЛЖК достигала 25,4 г/л на 2 сутки и снижалась к 20 суткам эксперимента. В Маг10 и Маг20 максимальная концентрация ЛЖК на 2 сутки достигала 28,4 и 28,8 г/л, но практически полное разложение ЛЖК происходило к 38 суткам для Маг10 и к 20 суткам для Маг20. Можно предположить, что во флаконах серии ГАУ потребление ЛЖК было более активным уже в начале эксперимента, часть ЛЖК могла адсорбироваться на частицах ГАУ. В К1 происходило накопление ЛЖК в ходе всего эксперимента и к 38 суткам достигало концентрации 33 г/л. В К2 отмечалась аналогичная картина: ЛЖК постепенно накапливались, достигая концентрации 32 г/л на 38 сутки, небольшое снижение регистрировалось на 7 сутки, вероятно за счет потребления этанола. Эффект от добавления ЭМ был замечен в сравнении с контролями по степени удаления ОВ к концу эксперимента: для К1 степень удаления ОВ составила 3,5%, для

К2 – 9,3%, ГАУ10 и 20 – 38,2 и 40,9%, а для Маг10 и 20 – 37,5 и 39,5%. Значение рН на 20 сутки для флаконов с внесёнными ЭМ было значительно выше в сравнении с контролем: К1 – 4,07; К2 – 5,07; ГАУ10 – 7,6; ГАУ20 – 7,48; Маг10 – 6,17; Маг20 – 7,12, но к 43 суткам рН для Маг10 вырос и составил 7,0.

### Особенности морфологии биопленок на поверхности материалов

Характер биообрастания и морфологическое разнообразие сильно различались в зависимости от материала носителя. Неровная поверхность диатомита способствовала прикреплению микроорганизмов, материал был покрыт слоем (в среднем 2-3 мкм толщиной) хлопьеобразного биополимерного матрикса с большим количеством клеток разной морфологии (Рисунок 9а).

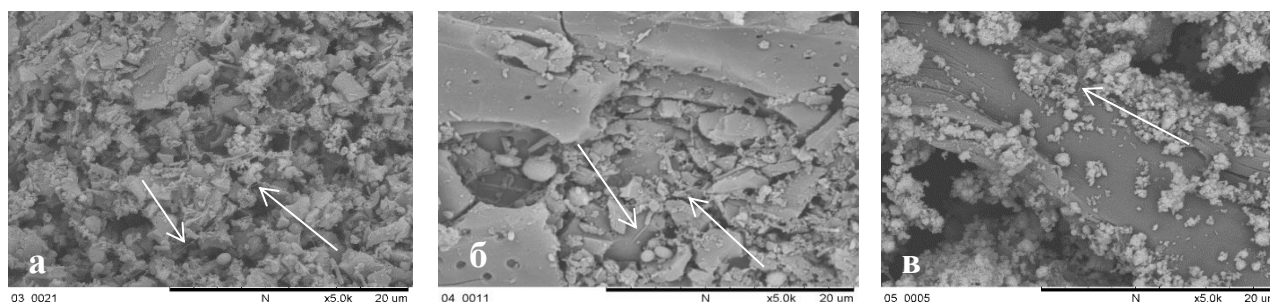


Рисунок 9. СЭМ изображения биопленок, полученных на разных материалах: а – диатомит; б– ГАУ; в–Маг. Стрелками указаны пилеподобные структуры.

На гладкой, пористой поверхности ГАУ наблюдали незначительное биообрастание (Рисунок 9б), основная часть биопленки скапливалась в углублениях и трещинах. Биообрастание на магнетите было самым интенсивным (Рисунок 9в), на поверхности просматривался плотный слой биопленки толщиной до 10-15 мкм, напоминающий хлопьевидную пенообразную массу. В составе всех трех биопленок были обнаружены пилеподобные структуры, соединяющие клетки друг с другом или с материалом.

### Анализ микробного сообщества

Анализ микробного сообщества был выполнен для проб ГАУ20 и Маг20, как лучших по комплексу параметров АС из соответствующих серий экспериментов, и контроля К2 (К). В конце эксперимента отбирали пробы из надосадочной жидкости (Жид), анализировали микроорганизмы обрастающие диатомит (Диат) и микроорганизмы, находящиеся на ЭМ. В ходе эксперимента в микробном сообществе К снижалась общая численность архей, доминирующим родом становился *Candidatus Methanoplasma*, количество архей родов *Methanothermobacter*, *Methanoculleus*, *Methanobrevibacter*, *Methanocorpusculum* и *Methanomassiliicoccus* существенно падало, но повышалась численность представителей рода *Methanosarcina*, что соответствует ингибированию процесса метаногенеза в К. В бактериальном компоненте сообщества также произошли значительные изменения: доминирующим родом стал *Caproiciproducens*, увеличилась численность представителей родов *Clostridium sensu stricto*

7, *Romboutsia*, *Turicibacter*, *Defluviitoga* и *Clostridium sensu stricto 1*. Внесение ГАУ положительно повлияло на численность гидрогенотрофных метаногенов родов *Methanothermobacter* и *Methanoculleus*, увеличилось количество миксотрофных метаногенов рода *Methanosarcina* и метилотрофных рода *Methanomassiliicoccus*. Бактериальный компонент микробного сообщества всех фракций был равномерным: доминировали представители групп *Lentimicrobiaceae*, *Hydrogenispora*, *Clostridia MBA03* и *Defluviitoga*; были представлены группы *Clostridia DTU014* и *Clostridia D8A-2*, а численность бактерий рода *Caldicoprobacter* существенно снижалась (Рисунок 10а). В ходе эксперимента доминирующим среди архей для Маг становился род *Methanosarcina*, для Диат и Жид - оставался род *Methanothermobacter*, в меньшей степени были представлены археи родов *Methanoculleus* и *Methanomassiliicoccus*. Бактериальная часть сообщества тоже менялась в ходе эксперимента: для всех фракций доминировали представители групп *Ruminiclostridium 1*, *Clostridium MBA03*, *Defluviitoga*, *Defluviitalea* и *Lentimicrobiaceae*, в меньшем количестве были представлены бактерии родов *Clostridia D8A-2* и *Herbinix* (Рисунок 10б). Таким образом, добавление ГАУ и Маг в качестве электропроводящего материала стимулировало развитие электрогенных и синтрофных групп микроорганизмов, в том числе и потенциальных САО. Можно заметить, что в сообществе преобладали разные специфические группы в зависимости от добавленного материала: для ГАУ это *Lentimicrobiaceae*, *Hydrogenispora*, *Clostridia MBA03* и *Defluviitoga*, а для Маг – *Ruminiclostridium 1*, *Clostridium MBA03*, *Defluviitoga*, *Defluviitalea* и *Lentimicrobiaceae*.

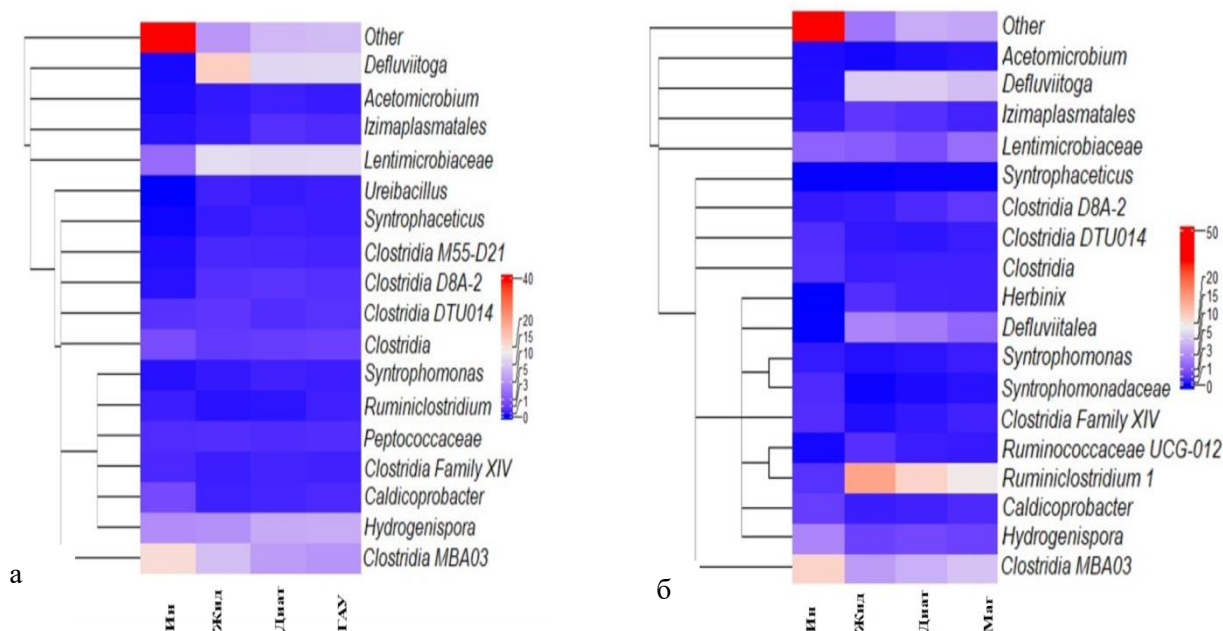


Рисунок 10. Профиль бактериального компонента сообщества для: ГАУ (а) и Маг (б) на уровне родов при твердофазном АС ОФ-ТКО.

В целом, добавление, как гранулированного активированного угля, так и магнетита может улучшать термофильное твердофазное АС ОФ-ТКО, даже несмотря на то, что накопление ЛЖК было чрезвычайно высоким (~ 28-30 г/л), что привело к полной остановке

метаногенеза в контрольных вариантах. Наиболее высокие дозировки электропроводящих материалов (20 г на флакон) показали наилучшие результаты. Обогащение биопленок на ГАУ и Маг различными синтрофными и потенциально электроактивными микробными группами свидетельствует о наличии специфических предпочтений этих групп к природе материала.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Среди способов улучшения характеристик процесса АС особое место занимает стимуляция DIET за счет внесения в анаэробный реактор электропроводящих материалов. Однако не до конца понятно, насколько DIET эффективен для разных типов АС, которые различаются влажностью субстрата, нагрузкой по ОВ, содержанием ЛЖК, периодичностью подачи субстрата в реактор и другими параметрами. В эксперименте с использованием в качестве субстрата низкоконцентрированного стока свинофермы впервые показана возможность стимуляции DIET за счет внесения как электропроводящих (сетка из нержавеющей стали), так и неэлектропроводящих (полиэфирный войлок) материалов, что подтверждалось увеличением потенциального выхода метана на 26,4% и 26,2%, соответственно, по сравнению с контролем, и вероятно было связано с активацией разных типов DIET в зависимости от внесенного материала. В эксперименте по анаэробному сбраживанию смеси летучих жирных кислот в высокой концентрации показана аналогичная возможность стимуляции DIET за счет внесения как электропроводящих (сетка из нержавеющей стали и карбоновый войлок), так и неэлектропроводящих (полиэфирный войлок) материалов, однако у оптимальных вариантов менялась пара материал/инокулят. Согласно полученным результатам можно предположить, что при выборе оптимального материала-носителя, внесение которого существенно влияет на морфологию и топологию биопленок на его поверхности и активизацию определенного типа DIET, важное значение имеет исходный метаногенный инокулят, содержащий микробное сообщество специфического состава. В крупных лабораторных реакторах объемом 90 л, анаэробно сбраживающих смесь ОФ-ТКО и ОСВ в проточном режиме при постепенно увеличивающейся нагрузке с 2,4 до 12,12 кг ОВ/(м<sup>3</sup> сут), статистически достоверно подтверждено повышение продукции биогаза на 9% в реакторе с карбоновой тканью при наиболее высокой нагрузке. Увеличение выхода биогаза можно объяснить обогащением биопленки на карбоновой ткани синтрофными представителями родов *Tepidanaerobacter*, а также *Defluviitoga*, способного к DIET в смешанной культуре с представителями доминирующего в этой биопленке архейного рода *Methanotherix*. Впервые изучено влияние электропроводящих материалов разной природы (гранулированного активированного угля и магнетита) и их концентраций на процесс DIET в новой модели термофильного твердофазного АС ОФ-ТКО с пространственным разделением фаз (отходы физически отделены от электропроводящего материала). Несмотря на более низкую электропроводность, использование гранулированного активированного угля в целом показало

более высокую эффективность для улучшения процесса АС в высоконагруженной системе (накопление 28-30 г ЛЖК/л на пике ацидогенеза), что возможно объясняется лучшей поверхностью для биообрастания и наличием функциональных групп, благоприятствующих DIET. Пространственное разделение фракций позволило создать локальные зоны для наиболее благоприятного развития синтрофных и электроактивных бактерий групп *Clostridia MBA03*, *DTU014*, *D8A-2*, *Ruminiclostridium 1*, *Lentimicrobiaceae* и *Deffluviitoga* на поверхности электропроводящих материалов. При этом накопление разных потенциальных электрогенов в зависимости от использованного электропроводящего материала указывает на специфичность этих групп к природе материала.

Полученные в работе результаты показали значительный потенциал DIET для повышения эффективности процесса различных типов АС и представляют как фундаментальный, так и практический интерес, поскольку позволят интенсифицировать анаэробную переработку различных отходов в существующих биореакторах и могут быть использованы для создания новых.

## ВЫВОДЫ

1. Комбинации сетки из нержавеющей стали/сброженного навоза КРС и полиэфирного войлока/сброженного ОСВ, используемых в качестве материала носителя/инокулята соответственно, имеют наилучшие характеристики анаэробного сбраживания низкоконтрированного стока свинофермы.

2. Наилучшие характеристики анаэробного сбраживания смеси летучих жирных кислот в высокой концентрации имеют комбинации сетки из нержавеющей стали и карбонового войлока/сброженного ОСВ и полиэфирного войлока/сброженного КРС, используемых в качестве материала-носителя/инокулята соответственно.

3. В биопленках с ОСВ в качестве инокулята доминируют и проявляют способность к DIET представители групп *Coprothermobacter*, *Clostridium sensu stricto 1*, *Ureibacillus*, *Limnochordia*, *Coprothermobacter* и *Candidatus Caldatribacterium*, а со сброженным навозом КРС – предположительно синтрофные бактерии группы *MBA03* класса *Limnochordia*.

4. Увеличение нагрузки по органическому веществу от 2,4 до 12,1 кг ОВ/(м<sup>3</sup> сутки) при совместном сбраживании ОФ-ТКО и ОСВ приводит к статистически значимой ( $p < 0,05$ ) разнице в производстве биогаза между всеми реакторами, причем реактор с карбоновой тканью показывает наилучшую производительность и самое низкое накопление летучих жирных кислот.



5. В биопленке на карбоновой ткани доминируют синтрофные бактерии рода *Defluviitoga*, способные к DIET в смешанных культурах с преобладающими в биопленке метаногенными археями рода *Methanothrix*.

6. При твердофазном анаэробном сбраживании ОФ-ТКО в термофильном режиме процесс метаногенеза не происходит без добавления в реактор электропроводящих материалов, стимулирующих DIET. Добавление 20 г на флакон (66,6 г/кг) гранулированного активированного угля увеличивает максимальную скорость образования метана в два раза по сравнению с добавлением 10 и 20 г на флакон (33,3 и 66,6 г/кг) магнетита и 10 г на флакон (33,3 г/кг) угля.

7. В биопленках на гранулированном активированном угле и магнетите накапливаются электроактивные и синтрофные микроорганизмы групп *Clostridia MBA03*, *Lentimicrobiaceae*, *DTU014*, *D8A-2* и рода *Defluviitoga*, вероятно, участвующие в DIET.

8. Внесение электропроводящих и неэлектропроводящих материалов приводит к сукцессии микробных сообществ в сторону обогащения их микроорганизмами, способными к DIET разных типов, и улучшению характеристик анаэробного сбраживания.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

в рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных Scopus, WoS и RSCI,  
рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В.Ломоносова:

1. Ножевникова А.Н., Русскова Ю.И., Литти Ю.В., Паршина С.Н., Журавлева Е.А., Никитина А.А. Синтрофия и межвидовой перенос электронов в метаногенных микробных сообществах // Микробиология. – 2020. – Т. 89. – №. 2. – С. 131-151. DOI: 10.31857/S0026365620020111 (**IF РИНЦ = 1,05**) [Nozhevnikova A.N., Russkova Y.I., Litt Y.V., Parshina S.N., **Zhuravleva E.A.**, Nikitina A.A. Syntrophy and interspecies electron transfer in methanogenic microbial communities // Microbiology. – 2020. – V. 89. – № 2. – P. 129-147 DOI:10.1134/S0026261720020101 (**IF WoS = 1,5 Q 4; IF SJR = 0,35 Q 3**)]. Вклад автора в печатных листах: (2,27/0,681) (Здесь и далее в скобках приведен объем публикации в печатных листах и вклад автора в печатных листах).
2. **Zhuravleva E.A.**, Shekhurdina S.V, Kotova I.B., Loiko N.G., Popova N.M., Kryukov E., Kovalev A.A., Kovalev D.A., Litt Y.V. Effects of various materials used to promote the direct interspecies electron transfer on anaerobic digestion of low-concentration swine manure // Science of The Total Environment. – 2022. – V. 839. – P. 156073. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.156073> (**IF WoS = 9,8 Q 1; IF SJR = 1,95 Q 1**). (1,64/1,312)
3. **Zhuravleva E.A.**, Kovalev A.A., Kovalev D.A., Kotova I.B., Shekhurdina S.V., Laikova A. A., Krasnovsky A., Pygamov T., Vivekanand V., Li L., He C., Litt Y.V. Does carbon cloth really improve thermophilic anaerobic digestion performance on a larger scale? focusing on statistical analysis and microbial community dynamics // Journal of Environmental Management. – 2023. – V. 341. – P. 118124. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2023.118124> (**IF WoS = 8,7 Q 1; IF SJR = 1,68 Q 1**). (1,31/1,048)
4. Shekhurdina S., **Zhuravleva E.**, Kovalev A., Andreev E., Kryukov E., Loiko N., Laikova A., Popova N., Kovalev D., Vivekanand V., Litt Y. Comparative effect of conductive and dielectric materials on methanogenesis from highly concentrated volatile fatty acids // Bioresource Technology. – 2023. – V. 377. – P. 128966. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.128966> (**IF WoS = 11,4 Q 1; IF SJR = 2,47 Q 1**). (0,65/0,39)