

ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова»
Биологический факультет
ФГУ "Федеральный исследовательский центр "Фундаментальные основы биотехнологии"
Российской академии наук
Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского

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

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научные руководители:
доктор биологических наук, профессор
Котова Ирина Борисовна
кандидат биологических наук
Литти Юрий Владимирович

Москва – 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	6
Актуальность проблемы и степень ее разработанности.....	6
Цель и задачи работы.....	7
Научная новизна работы.....	8
Теоретическая и практическая значимость работы.....	8
Методология и методы исследования.....	8
Положения, выносимые на защиту.....	8
Степень достоверности и апробация результатов.....	9
Структура работы.....	9
Публикации.....	9
Личный вклад автора.....	9
Благодарности.....	10
РАЗДЕЛ 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
Глава 1. Анаэробное разложение органических веществ метаногенным микробным сообществом.....	11
1.1. Гидролитическая стадия.....	12
1.2. Ацидогенная стадия.....	13
1.3. Ацетогенная (синтрофная) стадия.....	14
1.3.1. Межвидовой перенос водорода (ИНТ) и формиата (IFT).....	15
1.3.2. Прямой межвидовой перенос электронов (DIET).....	17
1.3.2.1. DIET через e-пили.....	18
1.3.2.2. DIET через электронтранспортные белки, связанные с наружной мембраной и включающие цитохромы c-типа.....	18
1.3.2.3. DIET через небиологические электропроводящие материалы (ЭМ).....	19
1.4. Метаногенная стадия.....	19
Глава 2. Виды анаэробного разложения органического вещества и способы оптимизации процесса.....	22
2.1. Классификация видов АС.....	22
2.1.1. Режим реактора.....	22
2.1.2. Конструкция реактора.....	23
2.1.3. Содержание сухого вещества.....	23
2.1.4. Рабочая температура при АС.....	24
2.2. Способы оптимизации процесса АС.....	25
2.2.1. Предобработка субстрата.....	25

2.2.1.1. Физическая предобработка.....	26
2.2.1.2. Химическая предобработка.....	27
2.2.1.3. Термическая предобработка.....	28
2.2.1.4. Биологическая предобработка	29
2.2.2. Совместное сбраживание	30
2.2.3. Добавки для улучшения АС.....	31
2.2.3.1. Макро- и микроэлементы	31
2.2.3.2. Добавки, стимулирующие DIET	32
2.2.3.3. Биологические добавки	34
2.2.4. Оптимизация параметров АС	35
РАЗДЕЛ 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	36
Глава 3. Объекты и методы исследования, постановка экспериментов	36
3.1. Инокуляты.....	36
3.2. Субстраты.....	36
3.3. Материалы-носители.....	38
3.4. Постановка экспериментов.....	39
3.4.1. Изучение влияния 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 (Эксперимент 1)	39
3.4.2. Изучение влияния электропроводящей карбоновой ткани и инертной ткани из стекловолокна на характеристики совместного анаэробного сбраживания при высокой нагрузке по органическому веществу (Эксперимент 2).....	41
3.4.3. Изучение влияния разных количеств электропроводящего материала - гранулированного активированного угля (ГАУ) и магнетита, на скорость метанообразования и разложения ЛЖК при твердофазном анаэробном сбраживании (Эсперимент 3)	43
3.5. Определение кинетических параметров метаногенеза.....	44
3.6. Аналитические методы	45
3.7. Микроскопия.....	46
3.7.1. Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ)	46
3.7.2. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия (КЛСМ).....	46
3.8. Секвенирование ДНК.....	47
3.9 Статистические и биоинформатические методы	47
РАЗДЕЛ 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	49

Глава 4. Влияние карбонового войлока и сетки из нержавеющей стали (в сравнении с неэлектропроводящими аналогами) и метаногенного инокулята на характеристики анаэробного сбраживания низкоконцентрированного стока свинофермы и смеси летучих жирных кислот в высокой концентрации (Эксперимент 1)	49
4.1. Характеристика анаэробного сбраживания	49
4.1.1. Образование метана, кинетические параметры метаногенеза	49
4.1.2. Динамика образования и потребления ЛЖК, удаление органического вещества	58
4.2. Особенности морфологии биопленок на поверхности материалов	66
4.2.1. Результаты сканирующей электронной микроскопии	67
4.2.2. Результаты конфокальной лазерной сканирующей микроскопии	74
4.3. Анализ микробного сообщества	81
4.3.1. ОСВ	81
4.3.2. КРС	86
Основные результаты и выводы по Главе 4	90
Глава 5. Влияние электропроводящей карбоновой ткани и инертной ткани из стекловолокна на характеристики анаэробного сбраживания при высокой нагрузке по органическому веществу (Эксперимент 2)	91
5.1. Характеристика анаэробного сбраживания	91
5.1.1. Образование метана и биогаза	91
5.1.2. Динамика образования и потребления ЛЖК, удаление органического вещества, изменение рН	94
5.2. Анализ микробного сообщества	97
5.2.1. Инокулят	98
5.2.2. R1	98
5.2.3. R2	99
5.2.4. R3	99
5.2.5. Прикрепленные формы R2 и R3	101
5.3. Корреляционный анализ	103
Основные результаты и выводы по Главе 5	105
Глава 6. Влияние разных концентраций электропроводящего материала-гранулированного активированного угля (ГАУ) и магнетита на скорость разложения ЛЖК и метанообразования при твердофазном анаэробном сбраживании (Эксперимент 3)	106
6.1. Характеристика анаэробного сбраживания	106
6.1.1. Образование метана, кинетические параметры метаногенеза	106
6.1.2. Динамика образования и потребления ЛЖК, удаления органического вещества, рН	110

6.2. Особенности морфологии биопленок на поверхности материалов (СЭМ).....	115
6.3. Анализ микробного сообщества	117
6.3.1. Контроль	118
6.3.2. ГАУ	119
6.3.3. Магнетит	121
Основные результаты и выводы по Главе 6.....	126
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	127
ВЫВОДЫ.....	129
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	130
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	132

ВВЕДЕНИЕ

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 CO_2 , потребляемого метаногенными партнерами с образованием метана и 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 (Barua, 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 ДИЕТ.

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

Степень достоверности и апробация результатов

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.

РАЗДЕЛ 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ¹

Глава 1. Анаэробное разложение органических веществ метаногенным микробным сообществом

Анаэробное разложение органического вещества - это процесс, посредством которого почти любые органические отходы могут быть биологически преобразованы в другую форму в отсутствие кислорода. Разнообразные микробные популяции разлагают органические отходы с одновременным производством возобновляемой энергии и эффлюента, богатого питательными веществами. В процесс анаэробного разложения вовлечен ряд метаболических стадий, таких как гидролиз, ацидогенез, ацетогенез и метаногенез (Khalid et al., 2011; Cruz et al., 2022).

1. На стадии гидролиза органические полимеры, такие как крахмал, целлюлоза, белки и жиры расщепляются или деполимеризуются гидролитическими бактериями на сахара, аминокислоты, глицерин и длинноцепочечные жирные кислоты с помощью гидролитических экзоферментов (например, целлюлаза, амилаза, протеаза и липаза).

2. На ацидогенной стадии органические вещества превращаются бродильными бактериями в летучие жирные кислоты (ЛЖК), такие как пропионовая, масляная и др., а также в уксусную кислоту, спирты, водород и углекислый газ.

3. На ацетогенной стадии синтрофные микроорганизмы разлагают ЛЖК, а также спирты и некоторые другие соединения, образовавшиеся на этапах гидролиза и брожения, до ацетата, H_2 и CO_2 . Образующийся H_2 лимитирует процесс в концентрации выше 10^{-4} атм, поэтому для эффективного протекания процесса необходим водород-потребляющий партнер (McInerney et al., 2008).

4. На метаногенной стадии метаногенные археи метаболизируют муравьиную кислоту, уксусную кислоту, метанол, монооксид углерода, а также диоксид углерода и водород в метан (Рисунок 1) (Vajrai, Vajrai, 2017).

¹ Основные результаты, изложенные в данной главе, опубликованы в следующих научных статьях автора в журналах, индексируемых в базах данных WoS, Scopus 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., Litti 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)]

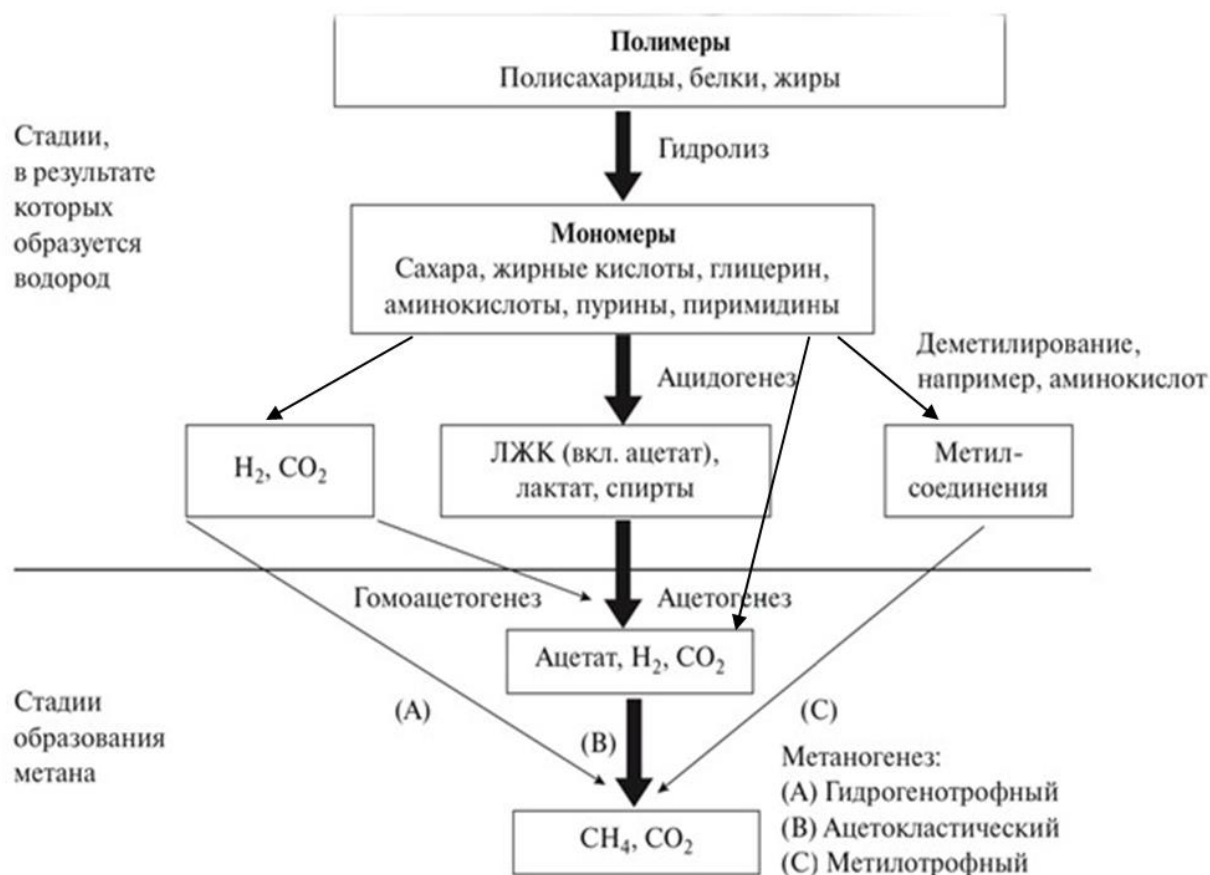


Рисунок 1. Образование биогаза анаэробным сообществом в условиях отсутствия нитратов, оксидов металлов и сульфатов (Schink, Stams, 2013; Shrestha, Rotaru, 2014; Sikora et al., 2017).

1.1. Гидролитическая стадия

Биомасса содержит сложные полимеры, недоступные для микроорганизмов на ацидогенной стадии без предварительного расщепления или предобработки. В процессе гидролиза гидролитические микроорганизмы секретируют внеклеточные ферменты, способные превращать углеводы, липиды и белки в сахара, длинноцепочечные жирные кислоты (ДЦЖК) и аминокислоты соответственно (Meegoda et al., 2018). Основной принцип работы внеклеточных ферментов основан на «разрезании» крупных молекул на более мелкие фрагменты, способные проникнуть в клетку и использоваться в качестве источника энергии и питания. Микроорганизмы могут выделять несколько различных ферментов или специализироваться и расщеплять только определенный субстрат (Таблица 1, Adekunle, Okolie, 2015). Гидролитические бактерии, участвующие в АС, относятся к пяти различным филумам: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Fibrobacter*, *Spirochaetes* и *Thermotogae*. Однако *Firmicutes* и *Bacteroidetes* считаются наиболее распространенными таксонами гидролитических бактерий при АС. Относительная численность гидролитических бактерий в основном зависит от типа

инокулята, рабочей температуры, времени удержания клеток и состава субстрата (Laiq Ur Rehman et al., 2019).

Таблица 1. Некоторые важные группы гидролитических ферментов и их функции (Adekunle, Okolie, 2015).

Фермент	Субстрат	Продукты распада
Протеиназа	Белок	Аминокислоты
Целлюлаза	Целлюлоза	Целлобиоза и глюкоза
Гемицеллюлаза	Гемицеллюлоза	Сахара (глюкоза, манноза, ксилоза и арабиноза)
Амилаза	Крахмал	Глюкоза
Липаза	Липиды	Жирные кислоты и глицерин
Пектиназа	Пектин	Сахара (галактоза, арабиноза, полигалактуроновая кислота)

Температура ферментации, при которой происходит АС, может существенно влиять на активность ферментов и, следовательно, на скорость гидролиза. Сравнивая психрофильные (20°C), мезофильные (30°C) и термофильные (40°C) условия, наблюдали увеличение скорости гидролиза субстрата с повышением температуры. Активность внеклеточных ферментов в мезофильных условиях (35°C) была почти в два раза ниже, чем в термофильных (55°C), за счет ингибирования функций мембраны и снижения степени поглощения субстрата (Nie et al., 2021). Для подавляющего большинства биоразлагаемых отходов гидролиз представляет собой узкое место процесса АС из-за низкой скорости и неполного разложения. Оптимизация и модернизация процесса с учетом всех лимитирующих факторов в перспективе приведет к более широкому использованию АС и улучшенной интеграции в промышленность (Menzel et al., 2020).

1.2. Ацидогенная стадия

Органические соединения (моносахара, аминокислоты и жирные кислоты), образованные на стадии гидролиза, метаболизируются ацидогенными (кислотообразующими) бактериями с образованием летучих жирных кислот, таких как уксусная, пропионовая, масляная и валериановая кислоты, наряду с углекислым газом, водой и водородом. Ацидогенные бактерии быстро растут со средним временем удвоения около 30 мин. ЛЖК являются промежуточными соединениями, рассматриваемыми как один из показателей эффективности АС. Однако накопление летучих жирных кислот приводит к снижению pH, ингибированию АС и подавлению роста самих ацидогенов, ацетогенов и метаногенов (Kothari

et al., 2014). Накопление ЛЖК, содержащих по 2–6 атомов углерода, может приводить к потере активности кислоточувствительных гликолитических ферментов. Кроме того, высокие уровни недиссоциированных ЛЖК, способных проникать через клеточные мембраны, повреждают макромолекулы в средах с низким рН, особенно у грамположительных бактерий. Ингибирующая концентрация ЛЖК сильно отличается для процессов АС, однако в литературе отмечено ингибирование ферментации глюкозы при концентрации ЛЖК выше 4 г/л (Yuan, Zhu, 2016). Бродильные микроорганизмы, образующие ЛЖК на ацидогенной стадии, относятся к филумам *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Firmicutes* и *Bacteriodota*, включают такие рода как *Bacillus*, *Clostridium*, *Salmonella*, *Streptococcus*, *Escherichia*, *Lactobacillus* и т.д. (Zhao et al., 2021).

1.3. Ацетогенная (синтрофная) стадия

Накопление и расщепление ЛЖК является важной стадией АС, ограничивающей скорость процесса. Накопление ЛЖК (уксусной, пропионовой, масляной и др.) сильно затрудняет АС, что делает ацетогенную стадию одной из лимитирующих (Zhao et al., 2021). Синтрофия в метаногенном микробном сообществе – это строго связанное мутуалистическое взаимодействие между синтрофными бактериями и метаногенными археями, включающее обмен водорода и метаболитов (таких как формиат). Ферментативные синтрофные микроорганизмы вырабатывают водород и формиат при сбраживании ЛЖК (например, ацетата, пропионата, бутирата, изобутирата, валерата и бензоата) (Kumar et al., 2021). Метаногенные партнеры используют продукты метаболизма ферментативных бактерий и поддерживают термодинамическое равновесие для синтрофной дегградации. Поддержание низкой концентрации водорода (10^{-4} атм и ниже) является обязательным условием для осуществления синтрофного разложения за счет снижения энергии Гиббса реакции до значений ниже нуля (Таблица 2) (McInerney et al., 2008; Schink, Stams, 2013). Микроорганизмы, осуществляющие синтрофное разложение ЛЖК, могут быть облигатными или факультативными, в зависимости от возможности самостоятельно без участия водород-потребляющего партнера, разлагать некоторые субстраты, например, сахара (Sekiguchi et al., 2006). Облигатными синтрофными микроорганизмами являются представители видов *Pelotomaculum propionicicum*, *Syntrophorhabdus aromaticivorans* и др. (Imachi et al., 2007; Qiu et al., 2008). Факультативными синтрофными бактериями являются представители видов *Thermoacetogenium phaeum*, *Pseudothermotoga lettingae*, *Clostridium ultunense*, *Syntrophaceticus schinkii*, *Tepidanaerobacter acetatoxydans*, *Syntrophobacter fumaroxidans*, *Smithella propionica*, *Pelotomaculum thermopropionicum* и др. (Westerholm et al., 2011; Sikora et al., 2017). В процессе превращения макромолекулярных органических соединений в метан электроны, полученные в результате разложения органических субстратов ферментативными бактериями, используются метаногенами для восстановления CO_2 до CH_4 . Следовательно, межвидовой перенос электронов

играет важную роль во всех вовлеченных реакциях (Zhang et al., 2023a). При АС межвидовой перенос электронов (МПЭ, IET) между синтрофными бактериями и водород-потребляющим партнером определяет эффективность производства метана. Межвидовой перенос электронов (IET) в синтрофном процессе в основном включает три типа, а именно межвидовой перенос водорода (ИТ), межвидовой перенос формиата (IFT) и прямой межвидовой перенос электронов (DIET). ИТ и IFT также называют опосредованным межвидовым переносом электронов (ПЕТ/МИЕТ, Zhao et al., 2021).

Таблица 2. Реакции синтрофного разложения и изменение стандартной энергии Гиббса (Stams, 1994; De Bok et al., 2004; Angelidaki et al., 2011; Stams et al., 2012; Schink, Stams, 2013).

Реакции без водород-потребляющего спутника	$\Delta G_o'$, кДж
$\text{Ацетат}^- + 4\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{HCO}_3^- + \text{H}^+ + \text{H}_2$	+105
$\text{Пропионат}^- + 3\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Ацетат}^- + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ + 3\text{H}_2$	+76
$\text{Пропионат}^- + 2\text{HCO}_3^- \rightarrow \text{Ацетат}^- + 3\text{Формиат}^- + \text{H}^+$	+72,4
$\text{Бутират}^- + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{Ацетат}^- + \text{H}^+ + 2\text{H}_2$	+48
$\text{Бутират}^- + 2\text{HCO}_3^- \rightarrow 2\text{Ацетат}^- + 2\text{Формиат}^- + \text{H}^+$	+45,5
Реакции с водород-использующим метаногеном	
$\text{Ацетат}^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_4 + \text{HCO}_3^-$	-31
$\text{Пропионат}^- + 1,75\text{H}_2\text{O} \rightarrow 1,75\text{CH}_4 + 1,25\text{HCO}_3^- + 0,25\text{H}^+$	-56,6
$\text{Бутират}^- + 2,5\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2,5\text{CH}_4 + 1,5\text{HCO}_3^- + 0,5\text{H}^+$	-81,7
Реакции утилизации водорода и формиата метаногенами и ацетогенами	
$4\text{H}_2 + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_4 + 3\text{H}_2\text{O}$	-135,6
$4\text{Формиат}^- + \text{H}^+ + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_4 + 3\text{HCO}_3^-$	-130,1
$4\text{H}_2 + 2\text{HCO}_3^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{Ацетат}^- + 4\text{H}_2\text{O}$	-105

1.3.1. Межвидовой перенос водорода (ИТ) и формиата (IFT)

До сих пор было показано, что только водород и формиат действуют как переносчики электронов в метаногенных консорциумах, хотя широкий спектр соединений-переносчиков, например, флаavin, гуминовая кислота, сульфид, цистеин и рибофлаavin, феназин и дисульфонат антрагидрохинона используются для восстановления сульфата или нерастворимых акцепторов электронов (Shen et al., 2016). Присутствие гидрогеназ/дегидрогеназ или формиатдегидрогеназ необходимо для цепной биохимической реакции посредством внеклеточного переноса электронов в синтрофных метаногенных консорциумах. Микроорганизмы с

гидрогеназой/дегидрогеназой могут непрерывно производить и потреблять водород посредством окислительно-восстановительной реакции между протоном и электроном, однако продукт будет зависеть от окислительно-восстановительного потенциала субстрата, связанного с гидрогеназой. Микроорганизмы, содержащие формиатдегидрогеназу, могут превращать формиат в H_2 и CO_2 . Окислительно-восстановительный потенциал пары формиат/ CO_2 составляет -432 мВ, что аналогично потенциалу H^+/H_2 (-414 мВ, Stams, Plugge, 2009; Zhang et al., 2023a). Микроорганизмы, содержащие гидрогеназы, восстанавливают протоны путем окисления восстановленного ферредоксина, НАДН и ФАДН₂. Реакции окисления восстановленного ферредоксина и НАДН энергетически выгодны, когда метаногены поддерживают достаточно низкое парциальное давление водорода, в то время как для реакции окисления ФАДН₂ требуется АТФ. Гидрогенотрофные метаногены получают энергию от восстановления CO_2 до CH_4 с использованием водорода в качестве донора электронов. Коэнзим F_{420} и окисленный ферредоксин восстанавливаются гидрогеназой, поглощающей водород, в качестве переносчика электронов (Рисунок 2). Восстановленный ферредоксин (Fd_{red}) и восстановленный F_{420} (F_{420-H_2}) действуют как доноры электронов на последовательных стадиях от CO_2 до уровней формила, метилена и метила (Stams et al., 2006; Baek et al., 2018).

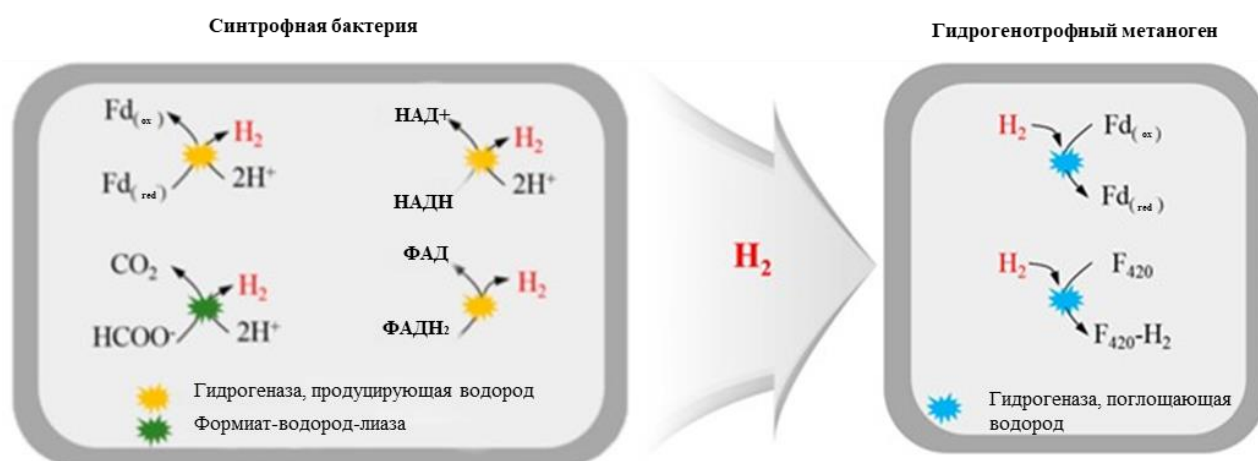


Рисунок 2. Межвидовой перенос водорода и внутриклеточные окислительно-восстановительные медиаторы потребления и производства водорода (по Baek et al., 2018).

Водород и формиат действуют одинаково, опосредуя электроны для ЦЕТ в процессах АС, однако они имеют разные физико-химические характеристики. Растворимость и константа диффузии водорода и формиата отличаются, поскольку растворимость водорода намного меньше, чем растворимость формиата, однако, водород диффундирует в воде примерно в 30 раз быстрее, чем формиат. Таким образом, ИГТ является предпочтительным механизмом, когда межбактериальные расстояния велики, тогда как ИНТ становится более благоприятным, когда эти расстояния малы, например в биопленках (De Bok et al., 2004). Основным ограничением ИНТ и ИГТ является зависимость от концентрации водорода в среде, приводящая к накоплению

ЛЖК, блокирующих синтрофный процесс. Повышение концентрации ЛЖК приводит к снижению рН, переходу ЛЖК в недиссоциированную форму, вызывающую повреждение клеток, и в конечном итоге, к ингибированию метаногенеза (Baek et al., 2016).

1.3.2. Прямой межвидовой перенос электронов (DIET)

По сравнению с ИТ и ИТ с использованием промежуточных продуктов метаболизма (H_2 /формиата) для передачи электронов, в DIET-процессе экзоэлектрогенные (доноры электронов) бактерии напрямую передают генерируемый электрон электротрофным (получающим электроны) микроорганизмам. DIET в сравнении с ПЕТ более энергоэффективен за счет отсутствия образования и потребления промежуточных продуктов, термодинамически благоприятен и скорость переноса электронов существенно выше (Wang, Lee, 2021; Zhang et al., 2023б). В настоящее время выделяют следующие три основных пути DIET: (1) через электронпроводящие пилы (e-pili, e-пилы); (2) через электронтранспортные белки, связанные с наружной мембраной и включающие цитохромы *c*-типа; (3) через небиологические ЭМ (Рисунок 3, Zhang et al., 2023а).

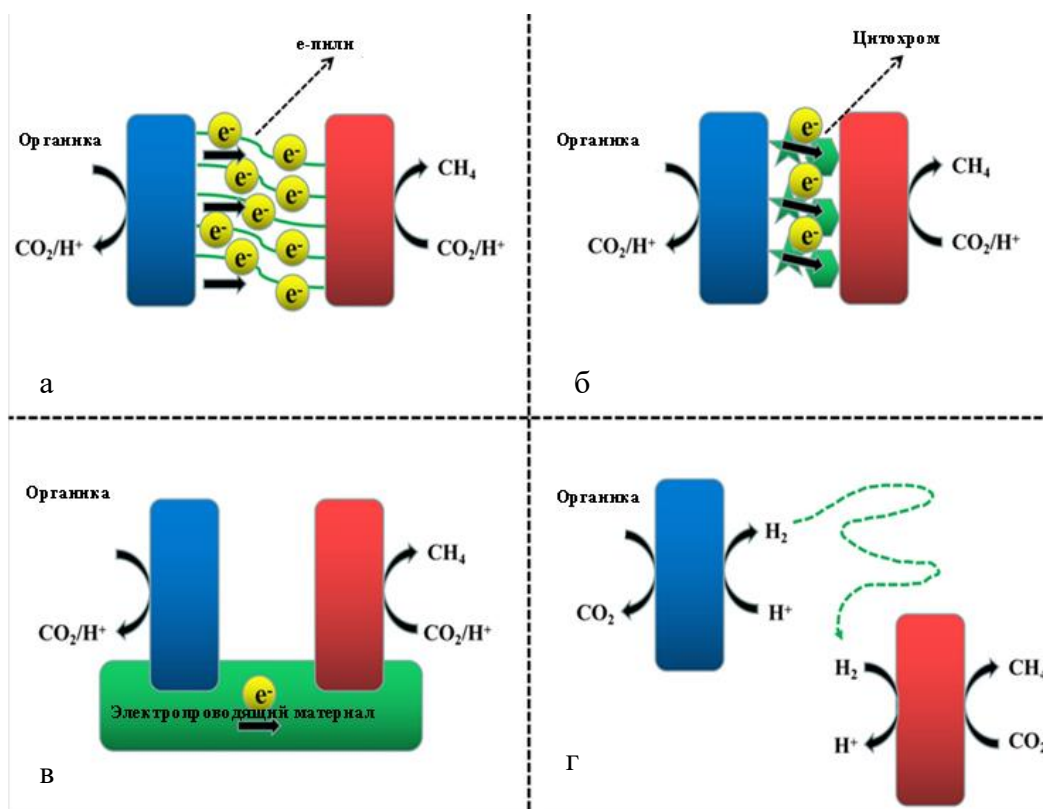


Рисунок 3. Схема межвидового переноса электронов между электродонорными бактериями (синий) и электроакцепторными метаногенами (красный) с помощью электронпроводящих пилей (e-пилы, а), через электронтранспортные белки, связанные с наружной мембраной и включающие цитохромы (б), через небиологические электропроводящие материалы (ЭМ, в), перенос электронов от клетки к клетке через промежуточные растворимые переносчики электронов, такие как H_2 (г) (по Zhao et al., 2020).

1.3.2.1. DIET через е-пили

Проводящие пили наблюдали во многих исследованиях с помощью атомно-силовой микроскопии (АСМ), сканирующей электронной микроскопии (СЭМ), сканирующей туннельной микроскопии (СТМ) и просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). Проводящие пили представляют собой белковые филаменты, образуемые микроорганизмами для дальнего переноса электронов в подходящих условиях. Через пили может происходить перенос электронов на большие расстояния без механизма прямого контакта клетки с нерастворимыми минералами, твердыми электродами, другими микроорганизмами и даже электропроводящей биопленкой (Baek et al 2018; Xu et al., 2019). Хотя механизмы проводимости е-пилей еще предстоит тщательно изучить, на данный момент предложено два. Первый возможный механизм — это металлическая проводимость, при которой электроны переносятся через сеть белковых филаментов через перекрывающиеся π -орбитали аминокислот: то есть делокализованные электроны генерируют проводимость. Второй механизм включает перескок или туннелирование электронов через е-пили между цитохромами (Yin, Wu, 2019; Li et al., 2021).

На данный момент определены гены, ассоциированные с DIET через е-пили, к ним относятся *pilA*, *pilB*, *pilC*, *pilM*, *pilQ*, *pilD*, *pilE*, *pilN*, *pilO*, *pilR*, *pilS*, *pilT*, *pilV*, *pilW*, *pilY* и *OmcS* (Van Steendam et al., 2019). Образование е-пилей было отмечено у представителей видов *Geobacter metallireducens*, *G. sulfurreducens*, *Pelotomaculum thermopropionicum*, *Shewanella oneidensis*; *Aeromonas hydrophila*, *Acidithiobacillus ferroxidans*, *Desulfovibrio desulfuricans* и *Rhodospseudomonas palustris* (Park et al., 2018a; Walker et al., 2018).

1.3.2.2. DIET через электронтранспортные белки, связанные с наружной мембраной и включающие цитохромы с-типа

Цитохромы представляют собой мембрансвязанные железосодержащие гемопротеины, переносящие электроны посредством окислительно-восстановительных реакций. Цитохромы могут быть одиночными (например, цитохром *c*) или связанными с другими цитохромами в комплексах (например, комплекс цитохрома *bc1*) (Cheng, Call, 2016). По сравнению с переносом электронов через е-пили, DIET с использованием цитохромов в качестве агента переноса требует тесного контакта синтрофного микроорганизма и электротрофного партнера, чтобы электрон мог эффективно передаваться (Wang et al., 2021). Сообщалось о протекании DIET с участием цитохромов с-типа между *Geobacter sulfurreducens* и *Geobacter metallireducens*, а также *Prosthecochloris aestuarii* и *Geobacter sulfurreducens* (Lovley, 2017; Sharma et al., 2019). На данный момент определены гены, ассоциированные с DIET через электронтранспортные

белки, связанные с наружной мембраной и включающие цитохромы *c*-типа, к ним относятся *OmcS*, *OmcZ*, *Gmet*, *OmcT*, *OmcC*, *MacA* и *PgcA* (Van Steendam et al., 2019).

1.3.2.3. DIET через небιологические электропроводящие материалы (ЭМ)

Альтернативой *e*-пилям и цитохромам для передачи электронов электроактивными микроорганизмами могут быть электропроводящие материалы на основе углерода или металлов (Xiao et al., 2021). Механизмы DIET через ЭМ можно разделить на три основные категории: (1) механизм прикрепления и роста соответствующих микроорганизмов на поверхности относительно больших ЭМ (например, гранулированный активированный уголь, ГАУ) и перенос электронов; (2) механизм ускорения переноса электронов путем замены цитохрома *c*-типа на наноразмерные ЭМ (например, магнетит); и (3) механизм переноса электронов между экзоэлектрогенами и метаногенными электротрофами путем формирования электронного канала из наноразмерных ЭМ (Kang et al., 2021). В ряде работ показано, что добавление ЭМ в процессе АС повышает устойчивость системы к дестабилизации (т.е. к высоким нагрузкам по органическому веществу, колебаниям рН и температуры), сокращает лаг-фазу, повышает скорость образования метана и разложения ЛЖК. DIET через ЭМ не зависит от парциального давления водорода, синтрофное разложение ЛЖК и образование метана не ингибируются (Nguyen et al., 2021). Представители родов *Geobacter*, *Syntrophomonas*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Coprothermobacter*, *Spirochaeta* и *Thauera* способны к DIET через небιологические проводящие материалы совместно с электротрофным партнером (Gahlot et al., 2020).

1.4. Метаногенная стадия

Метаногенная стадия является заключительным этапом АС органического вещества, осуществляемая специализированной группой микроорганизмов, принадлежащих к домену *Archaea* (Cai et al., 2021). Метаногенные археи разделяются на четыре группы в зависимости от используемого субстрата:

1. Гидрогенотрофные метаногены используют CO_2 и H_2 или формиат;
2. Ацетокластические метаногены используют ацетат;
3. Метилотрофные метаногены используют метилированные соединения, включая метанол, метилированные амины и метилированные сульфиды (Venkiteshwaran et al., 2015).
4. Метил-редуцирующие метаногены используют метилированные соединения и водород/формиат, которые являются источниками электронов (Sorokin et al., 2017).

Исследования показали, что значительная часть метана в метантенках в мезофильном режиме производится ацетокластическим путем, порядка 70%. Метилотрофный путь дает минимальное количество CH_4 (Venkiteshwaran et al., 2015). Установлено, что ацетокластические

метаногены растут медленнее по сравнению с гидрогенотрофными метаногенами (время удвоения 5–7 дней против 4–8 часов), что в том числе приводит к необходимости использования более длительного времени сбраживания. Ацетокластический метаногенез характеризуется более низкой кинетикой, в сравнении с гидрогенотрофным, что приводит к накоплению промежуточных продуктов (в основном органических кислот, таких как ацетат), высокой чувствительностью к параметрам окружающей среды, включая pH, наличие аммония и температуру и, следовательно, риском дестабилизации процесса АС (Zakaria et al., 2019).

Основные метаногенные пути (гидрогенотрофный, ацетокластический и метилотрофный) задействуют консервативное ядро ферментов (FWD/FMD, FTR, MCH, MTD/HMD, MER, MTR и MCR), общих для всех порядков метаногенов. Последний этап всех этих путей образования метана состоит из превращения метил-кофермента М (метил-S-CoM) в CH₄ и осуществляется одним и тем же ферментным комплексом у всех метаногенов – метил-кофермент М-редуктазой (MCR). Электроны, используемые для этой реакции восстановления, поступают либо от H₂, либо от восстановленного кофактора F₄₂₀ (F₄₂₀H₂) в зависимости от пути метаногенеза (Рисунок 4) (Borrel et al., 2013).

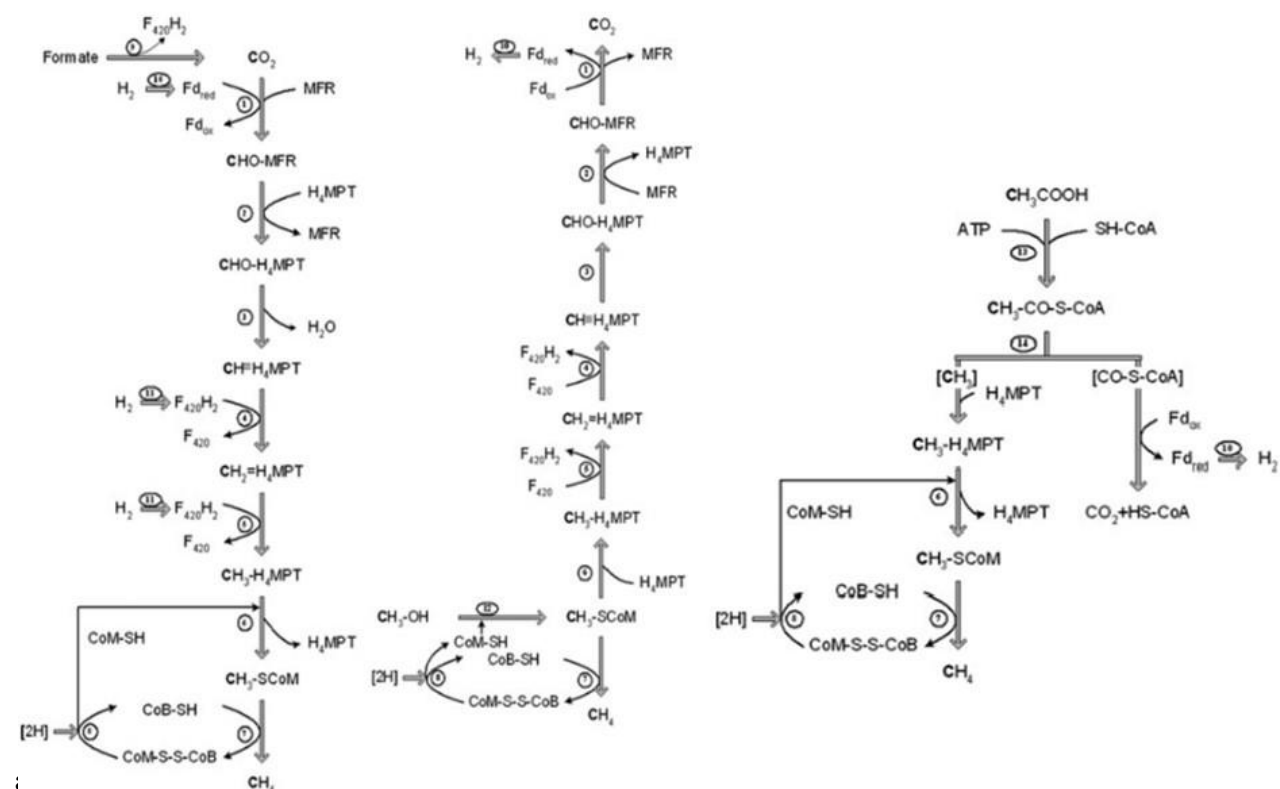


Рисунок 4. Пути метаногенеза: (а) Гидрогенотрофный; (б) Метилотрофный; (в) Ацетокластический; Fd_{red} – ферредоксин восстановленный; Fd_{ox} – ферредоксин окисленный; F₄₂₀H₂ – восстановленная форма кофермента F₄₂₀; MFR – метанофуран; H₄MPT –

тетрагидрометанооптерин; CoM-SH – кофермент M; CoB-SH – кофермент B; CoM-S-S-CoB – гетеродисульфид CoM и CoB; CoA-SH – кофермент A.

Ферменты:

1. формилметанофурандегидрогеназа (FMD);
2. формилметанофурантетрагидрометанооптерин формилтрансфераза (FTR);
3. метилтетрагидрометанооптерин циклогидролаза (MCH);
4. F₄₂₀H₂-зависимая метилтетрагидрометанооптерин дегидрогеназа (MTD);
5. Метилтетрагидрометанооптеринредуктаза (MER);
6. метилтетрагидрометанооптерин: коэнзим M-метилтрансферазный комплекс (MTR);
7. метилкофермент-M-редуктаза (MCR);
8. гетеродисульфидредуктаза (HDR);
9. формиатдегидрогеназа (FDH);
10. энергопреобразующая ферредоксинзависимая гидрогеназа (ECH);
11. F₄₂₀-восстанавливающая гидрогеназа (FRH);
12. метилтрансфераза;
13. ацетаткиназа (AK)-фосфотрансацетилаза (PTA) у *Methanosarcina*; АМР-формирующая ацетил-СоА-синтетаза у *Methanosaeta*; СО дегидрогеназа/ацетил-КоА-синтаза (CODH/ACS) (Liu, Whitman, 2008).

К строго анаэробным культивируемым метаногенам в филуме *Euryarchaeota* домена *Archaea* относятся представители порядков *Methanobacteriales*, *Methanococcales*, *Methanomicrobiales*, *Methanosarcinales*, *Methanopyrales*, *Methanocellales* и *Methanomassiliicoccales*. Недавно добавлены классы некультивируемых метаногенов: "*Ca. Methanofastidiosa*" и "*Methanonatronarchaeia*", относящиеся к филуму *Euryarchaeota*. Гидрогенотрофные метаногены - самая большая группа, в нее входят порядки *Methanobacteriales*, *Methanococcales*, *Methanomicrobiales*, *Methanopyrales*, *Methanocellales* (Schlegel, Muller, 2013). К ацетокластическим метаногенам относятся представители двух родов *Methanosarcina* и *Methanotherix* (*Methanosaeta*), относящиеся к порядку *Methanosarcinales*. Представители рода *Methanotherix* (*Methanosaeta*) являются строго ацетокластическими, представители рода *Methanosarcina* способны использовать в качестве субстратов для образования метана не только ацетат, но и H₂/CO₂, а также метанол и метильные соединения (Smith, Ingram-Smith, 2007). Метилотрофные метаногены относятся к порядку *Methanosarcinales*, семейству *Methanosarcinaceae*. Метил-редуцирующие метаногены - это виды *Methanosphaera stadtmanae* (относится к порядку *Methanobacteriales*) и *Methanomicrococcus*

blatticola (относится к порядку *Methanosarcinales*), а также некоторые виды порядка *Methanomassiliicoccales* (Sorokin et al., 2017).

Глава 2. Виды анаэробного разложения органического вещества и способы оптимизации процесса

2.1. Классификация видов АС

АС классифицируются по критическим рабочим параметрам, таким как режим подачи субстрата (периодический, полупериодический и непрерывный), рабочая температура (психрофильный, мезофильный и термофильный), конструкция реактора и содержание твердых частиц (Taconi et al., 2008; Li et al., 2011).

2.1.1. Режим подачи субстрата

Реакторы периодического действия характеризуются отсутствием добавления/извлечения субстрата во время АС. Периодические реакторы широко используются в промышленности и лабораториях (Liu, 2017). Полунепрерывные реакторы питают субстратом с перерывами. Некоторая часть эффлюента, выходящего из реактора, смешивается с субстратом перед повторным введением в реактор, тогда как остальная часть эффлюента отбрасывается (Rosamora et al., 2022). Непрерывный режим реактора характеризуется добавлением субстрата и удалением соответствующего количества эффлюента через равные промежутки времени (Chiu, Lo, 2016). АС в непрерывном режиме может осуществляться в одно- или двухстадийных системах. В двухстадийной системе АС стадии гидролиза, ацидогенеза и ацетогенеза происходят в первом реакторе, а метаногенез происходит во втором реакторе. В одностадийной системе все стадии, включающие гидролиз, ацидогенез и метаногенез происходят одновременно в одном объёме, что позволяет упростить конструкцию реактора (Franca, Bassin, 2020). Двухстадийная система АС в сравнении с одностадийной характеризуется более высокой стабильностью процесса, эффективной переработкой субстрата с высокой нагрузкой по органическому веществу и повышенным конечным выходом биометана (Srisowmeya et al., 2020). Важными характеристиками работы реактора являются такие параметры как гидравлическое время удержания (ГВУ) и нагрузка по органическому веществу (OLR). Под ГВУ понимают период, в течение которого растворимый субстрат находится внутри реактора вместе с биомассой (Bella, Rao, 2023). Выбор ГВУ зависит от температуры процесса и состава субстрата. Обычно ГВУ в мезофильном режиме колеблется в пределах от 10 до 40 дней, тогда как для термофильных условий ГВУ короче – 14 дней. Нагрузка по органическому веществу (OLR) определяет содержание органического вещества, ежедневно загружаемого в расчете на единицу объема реактора. Увеличение OLR приводит к увеличению удельного выхода биогаза,

однако, превышение оптимального уровня снижает производительность реактора (Náthia-Neves et al., 2018; Nkuna et al., 2021).

2.1.2. Конструкция реактора

В настоящее время используются различные типы реакторов, и каждая конструкция связана с типом сбраживаемого субстрата, с коэффициентами капиталовложений и с основной функцией АС. Начиная с более ранних систем АС, концепции конструкции были улучшены по сравнению с классическими реакторами. К классическим реакторам относятся септические резервуары и анаэробные пруды, а к современным – высокопроизводительные конфигурации реакторов, такие как реактор с постоянным перемешиванием (CSTR), анаэробный реактор с придонным слоем микроорганизмов и восходящим потоком жидкости (UASB), трубчатые реакторы (tubular), анаэробные последовательно-периодические биореакторы (ASBR), реакторы с расширенным слоем гранулированного ила (EGSB), анаэробные биофильтры (AF), реакторы с пульсирующим потоком (PFR), реакторы с псевдооживленным слоем (AFB), колебательные проточные реакторы (OFR) (Van Haandel et al., 2006; Akil et al., 2012; Nasir et al., 2012). Современные реакторы могут аккумулировать высокую концентрацию биомассы и обеспечивать длительное время удержания твердого вещества (SRT) даже при низком ГВУ, получив более широкое применение при переработке различных видов отходов. Для современных реакторов улучшены характеристики процесса АС, например, перемешивание, скорость процесса и т.д. (Nasir et al., 2012). В зависимости от типа реактора различаются основные параметры процесса (Таблица 3) (Rajeshwari et al., 2000).

Таблица 3. Характеристики различных типов реакторов.

Тип реактора	Период запуска (день)	Рециркуляция эффлюента	Типичная нагрузка по ОВ (кг ХПК/м ³ сутки)	ГВУ (сутки)
CSTR	–	–	0,25–3	10–60
UASB	4–16	–	10–30	0,5–7
AF	3–4	–	1–40	0,5–12
AFB	3–4	+	1–100	0,2–5

2.1.3. Содержание сухого вещества

АС разделяется по содержанию сухого вещества в сбраживаемой биомассе, так при содержании сухого вещества > 15% анаэробное сбраживание считается твердофазным анаэробным сбраживанием (ТФ АС), а при содержании сухого вещества < 10% – сбраживанием

с низким содержанием твердых веществ (Peng et al., 2020). Еще один вариант разделения АС в зависимости от содержания сухого вещества (СВ) в субстрате включает три категории: мокрое ($<10\%$ СВ), полусухое ($10\% < \text{СВ} < 15\%$) и сухое ($\geq 15\%$ СВ) (Wang et al., 2023a). В мокрых системах (СВ $< 10\%$) реакторы, необходимые для работы с разбавленным субстратом, являются дорогостоящими, а потребление воды очень велико для достижения желаемого общего содержания твердых веществ. Кроме того, операции механического смешивания и повторного использования твердых веществ являются дорогостоящими как с точки зрения капитальных, так и энергетических затрат (Franca, Bassin, 2020). Применение ТФ АС позволяет снизить потребление воды, уменьшить размер реактора, увеличить нагрузку по органическому веществу (OLR), предотвратить или уменьшить обезвоживание эффлюента, снизить потребность в подогреве. Однако у ТФ АС есть недостатки, в частности выход метана ниже, удаление органического вещества меньше, чем 50%, требуются дополнительные затраты на систему перемешивания/прокачки в реакторе (Fagbohunge et al., 2015). К недостаткам ТФ АС также относятся затрудненный массоперенос, высокий уровень эндогенных ингибиторов АС, включая аммонийный азот и ЛЖК. Накопление ЛЖК и аммонийного азота будет приводить к закислению, ингибированию метаногенов и дальнейшей дестабилизации всей системы (Meng et al., 2020). ТФ АС идеально подходит для гетерогенных твердых биоотходов, таких как лигноцеллюлозные отходы, сепарированные органические вещества и органическая фракция твердых коммунальных отходов (ТКО). Хотя некоторые ТФ АС работают в полунепрерывном режиме, более широкое распространение получили периодические системы из-за простоты их эксплуатации. Поскольку для такого сырья сложно обеспечить активное перемешивание, в системах ТФ АС часто используется рециркуляция жидкого инокулята (фильтрата/перколята) для эффективного распространения микроорганизмов и массопереноса (de Albuquerque et al., 2022; Rosamora et al., 2022). Одной из перспективных технологий ТФ АС является «гаражный» тип сбразивания (ГТС), подходящий для широкого спектра субстратов и характеризующийся более низким потреблением энергии за счет отсутствия перемешивания (Qian et al., 2016). Субстрат неподвижен в отсеке для АС, что повышает устойчивость ГТС к физическим загрязнителям (камни, стекло, песок и тд) и увеличивает стабильность системы за счет снижения износа оборудования (Rico et al., 2020).

2.1.4. Рабочая температура при АС

Температура играет важную роль в АС, поскольку под влиянием температуры формируются микробные экосистемы и, следовательно, регулируется стабильность процесса АС (Nie et al., 2021). Процесс АС можно классифицировать по рабочей температуре, являющейся одним из ключевых параметров, подлежащих контролю. Температура влияет не только на активность ферментов и коферментов, но и на выход метана и качество эффлюента.

Как правило, анаэробные микроорганизмы могут расти в психрофильных (10–30°C), мезофильных (30–40°C) и термофильных (50–60°C) условиях (Franca, Bassin, 2020). АС в термофильных условиях обладает рядом преимуществ по сравнению с мезофильным и психрофильным процессами. В термофильных условиях происходит более быстрое разложение органических веществ, достигается более высокое содержание метана в биогазе и низкое содержание сероводорода, более высокая рекуперация энергии, потребность в меньшем объеме реактора, уничтожение патогенов, сниженная влажность эффлюента и низкое пенообразование в реакторе. Однако работа в термофильных условиях требует более тщательного наблюдения и контроля из-за дополнительного риска ингибирования процесса аммиаком, накопления ЛЖК и тяжелых металлов, а также дополнительных экономических затрат на нагрев реактора (Guo et al., 2014; Gebreeyessus et al., 2016; Meegoda et al., 2018; Ryue et al., 2020). Мезофильное АС получило широкое распространение на практике в большинстве случаев из-за меньшей потребности в дополнительной энергии для подогрева реактора и высокой стабильности процесса. Однако к недостаткам мезофильного АС относятся более высокие капитальные затраты на постройку реактора и более низкая скорость процесса (Gebreeyessus, Jenicek, 2016). АС в мезофильном и термофильном режимах – более изученные технологии в сравнении с психрофильным АС (Tiwari et al., 2021). Снижение температуры пагубно влияет на различные параметры работы системы АС и оказывает сильное негативное влияние на микробный рост и ферментативную активность, особенно у мезофилов и термофилов. Психрофилы, однако, развили ряд генотипических и фенотипических адаптивных особенностей, которые позволили преодолевать барьеры, связанные с холодной средой. Перспективным направлением является изучение биоаугментации психрофильными микроорганизмами при АС, а также адаптация микробных сообществ к психрофильным условиям (Petrooulos et al., 2018; Akindolire et al., 2022). Преимуществами психрофильного АС является существенное снижение потребления энергии, необходимой для нагрева биореактора, и актуальная технологическая возможность для регионов с холодным климатом (Saady, Massé, 2013).

2.2. Способы оптимизации процесса АС

К основным способам улучшения процесса АС относятся применение различных добавок, предварительная обработка субстрата, совместное сбраживание и оптимизация параметров процесса (Cui et al., 2021).

2.2.1. Предобработка субстрата

Основной целью предобработки является повышение доступности субстрата для микроорганизмов. За счет предобработки уменьшается размер частиц, увеличивается площадь поверхности и упрощается состав субстрата, что повышает ферментативную активность

микроорганизмов. Предварительная обработка приводит к увеличению степени и скорости разложения субстрата, высоким скоростям производства биогаза, метана и меньшим объемам остаточных твердых частиц для конечной утилизации после АС. За счет предварительной обработки можно сократить ГВУ субстрата в реакторе, что приводит к уменьшению объема/занимаемой площади реактора и снижает капитальные затраты на биогазовую установку (Atelge et al., 2020). Методы предварительной обработки делятся на четыре основные группы: физические, химические, термические и биологические (Jain et al., 2015).

2.2.1.1. Физическая предобработка

Основной целью физической предварительной обработки является уменьшение размера частиц в субстрате, приводящее к увеличению удельной площади и обеспечение лучшего контакта между субстратом и инокулятом (анаэробными микроорганизмами), что в конечном итоге улучшает АС. Методы физической предварительной обработки включают механические операции, различные виды облучения и предварительную ультразвуковую обработку (Jain et al., 2015; Amin et al., 2017; Meegoda et al., 2018). Предварительная механическая обработка включает в себя различные способы измельчения, дробления, помола и т. д. Основная цель механической обработки заключается в разрушении твердых частиц с последующим высвобождением фрагментов биомассы небольшого размера и увеличением общей проницаемости субстрата. Различные исследования показали, что более крупные частицы приводят к снижению химического потребления кислорода (ХПК) и меньшему производству биогаза при АС (Paudel et al., 2017; Nguyen et al., 2021). Предобработка облучением осуществляется гамма-лучами (γ), электронным пучком или микроволнами. В результате γ -облучения образуются высокореакционноспособные частицы (такие как $\bullet\text{OH}$, $\bullet\text{H}$ и e^-_{aq}), осуществляющие окислительно-восстановительные реакции с органическим веществом (Ling et al., 2022). Метод облучения электронным пучком за счет образования высокореакционноспособных химических соединений (свободные радикалы, ионы, и т.д.), аналогично γ -излучению, позволяет разрушать клетки и впоследствии повышать эффективность удаления органических веществ при АС (Shin, Kang, 2003). Микроволновое излучение не способно разрушить химические связи, однако воздействует на водородные связи и приводит к изменению вторичной и третичной структуры белков, вызывая гидролиз клеток (Passos et al., 2013). К недостаткам облучения как метода предобработки относится дороговизна и трудность промышленного применения (Taherzadeh, Karimi, 2008). Предварительная ультразвуковая обработка представляет собой применение циклического звукового давления (ультразвука) с частотой, превышающей верхний предел человеческого слуха. В ходе ультразвуковой предобработки создается кавитация, вызывающая лизис клеток и приводящая к растворению ОВ (органического вещества) субстрата (Apul, Sanin, 2010; Meegoda et al., 2018).

2.2.1.2. Химическая предобработка

Предварительная химическая обработка используется для разрушения органических соединений сильными кислотами, щелочами или окислителями. Химическая предобработка не подходит для легко биоразлагаемых субстратов за счет ускоренного накопления ЛЖК при АС, но эффективна для трудноразлагаемых, например богатых лигнином (Ariunbaatar et al., 2014). По сравнению с другими методами, щелочная предварительная обработка имеет ряд преимуществ: простота состава соединений и эксплуатации, высокая эффективность. Большинство исследований выявило увеличение образования метана и снижение содержания органического вещества, особенно при низкоконтрированном щелочном воздействии. Щелочная предобработка разрушает агрегаты и клеточные стенки гидроксильными анионами. Чрезвычайно высокий уровень рН вызывает естественную потерю структуры белков, омыление липидов и гидролиз РНК (Wonglertarak, Wichitsathian, 2014). Основными реактивами для щелочной химической предобработки являются гидроксид натрия (NaOH) и гидроксид кальция (Ca(OH)₂). NaOH обеспечивает высокую эффективность солюбилизации в сравнении с Ca(OH)₂, но существенно увеличивает стоимость предварительной обработки (Torres, Lloréns, 2008). Кислотная предварительная обработка эффективна для субстратов, богатых лигноцеллюлозой, поскольку кислоты разрушают лигнин, а гидролитические микроорганизмы способны адаптироваться к кислым условиям. Наиболее важной реакцией, протекающей при кислотной предварительной обработке, является гидролиз гемицеллюлозы до моносахаридов, при этом лигнин конденсируется и выпадает в осадок (Jain et al., 2015). Обычно используемыми кислотными реагентами для предварительной обработки являются H₂SO₄, H₃PO₄, CH₃COOH и т.д. Применение органических кислот также может быть включено в кислотную предобработку (Yu et al., 2019). Недостатком предварительной обработки сильными кислотами является коррозионное действие кислот и появление гидроксиметилфурфурола (ГМФ) или фурфуроловых соединений, ингибирующих анаэробное сбраживание. Преимуществом при использовании разбавленных кислот является отсутствие образования ГМФ или фурфурола (Sołowski et al., 2020). Стоимость кислотной предобработки выше, чем щелочной, что является одним из существенных недостатков технологии (Meegoda et al., 2018). В основе озонирования, как метода предобработки, лежит способность озона окислять широкий спектр органических и неорганических соединений. Озон обладает целлюлозолитической активностью, реагирует с полисахаридами, белками и липидами (компонентами клеточных мембран), превращая их в соединения с меньшей молекулярной массой. Клеточная мембрана в ходе озонирования разрывается, выплескивая цитоплазму. Если доза озона достаточно высока, может также происходить минерализация высвобождаемых клеточных компонентов. При озонировании увеличиваются концентрации растворимого азота, фосфора и ХПК в субстрате (Elliott et al.,

2007; Chu et al., 2009). Недостатком озонирования является дороговизна технологии, поскольку необходимы высокие энергетические, эксплуатационные и капитальные затраты (Khadaroo et al., 2019).

2.2.1.3. Термическая предобработка

Термическая предварительная обработка повышает доступность неразлагаемых или трудноразлагаемых соединений для микроорганизмов, увеличивая выход биогаза при последующем АС. К термической предобработке относятся гидротермальная, паротермическая, микроволновая и обработка паровым взрывом (Scherzinger, Kaltschmitt, 2021). Гидротермальная предварительная обработка (ГПО) является эффективным методом повышения степени деградации органических соединений (Kim et al., 2015). Во время гидротермической предварительной обработки биомасса инкубируется с водой при высокой температуре (от 150°C до 260°C) и давлении (Dai et al., 2018; Agarwal et al., 2022). Применение ГПО эффективно для улучшения обезвоживаемости и увеличения производительности анаэробного сбраживания, поскольку повышает доступность нерастворимых органических веществ за счет разрушения межмолекулярных и внутримолекулярных связей. ГПО особенно подходит для субстратов, уже содержащих большое количество воды. Гидротермальная предварительная обработка увеличивает ХПК и степень гидролиза нерастворимых органических соединений субстрата (Scherzinger, Kaltschmitt, 2021; Kakar et al., 2022). ГПО биомассы подразделяется на гидротермальное сжижение, гидротермальную газификацию и относительно новую категорию – гидротермальную карбонизацию. Основными параметрами гидротермальной предобработки, влияющими на эффективность процесса, являются температура, время реакции, общее содержание твердых веществ и pH (Ahmad et al., 2018). Недостатком ГПО является высокая потребность в энергии, что ограничивает коммерциализацию в широких масштабах (Singh, Garg, 2022). В отличие от ГПО, при паротермической предварительной обработке (ППО) исходные вещества окружены не жидкой водой, а водяным паром, что существенно снижает время нагревания. ППО гораздо более энергоэффективна в сравнении с ГПО, поскольку для обработки требуется меньше тепла, поступающего из внешних источников. При ППО тепловая обработка происходит в диапазоне температур между 180 и 250°C, а уровень давления колеблется от 2 до 10 Мпа. Технически ППО различается по способу подачи пара в реакционную емкость. Пар может вводиться непосредственно в реактор, либо в субстрат добавляется вода и смесь подается в нагреваемый реактор, где происходит испарение (Scherzinger, Kaltschmitt, 2019; Scherzinger, Kaltschmitt, 2021).

Предварительная обработка с помощью микроволн успешно используется для различных типов биомассы. Микроволны (МВ) — это электромагнитные волны с длиной волны в диапазоне 0,01–1 м и соответствующей частотой в диапазоне от 0,3 до 300 ГГц (Xu, 2015). МВ

обладают термическим, атермическим и эффектом каталитического окисления, разрушающими клетки и флоккулы субстрата. Термический эффект включает растворение органического вещества за счет денатурации мембранных белков и превышения температуры кипения внутриклеточной жидкости. Атермический эффект обусловлен быстрыми колебаниями полярных и поляризуемых молекул или поляризованных боковых цепей макромолекул. Каталитическое окисление связано с образованием гидроксильных радикалов во время микроволнового облучения (Bozkurt, Apul, 2020). Основными преимуществами МВ предобработки являются высокая скорость реакций, селективность, низкие затраты энергии, повышение эффективности ферментативного гидролиза (Sarçi, 2013; Xu, 2015). На эффективность предобработки влияют температура, время излучения и глубина проникновения МВ (Park, Ahn, 2011). Недостатком МВ предобработки является высокая стоимость (Li et al., 2016).

Предварительная обработка паровым взрывом включает воздействие на биомассу высокотемпературным паром под давлением в течение короткого периода времени перед быстрым сбросом давления в случае взрывной декомпрессии. Эффективность обработки паровым взрывом зависит от таких факторов как температура, время пребывания, размер частиц и содержание влаги в субстрате (Yu et al., 2012). Преимуществами применения парового взрыва в качестве метода предобработки являются ограниченное потребление энергии, слабое воздействие на окружающую среду, повышение эффективности ферментативного воздействия на субстрат, низкие капиталовложения и отсутствие использования опасных химических веществ (Duque et al., 2016; Ziegler-Devin et al., 2021). К недостаткам метода обработки паровым взрывом относится неполное разрушение полимеров (например, лигнина), накопление ингибирующих соединений и необходимость дополнительной промывки гидролизата (Agbor et al., 2011; Singh et al., 2015).

2.2.1.4. Биологическая предобработка

Биологическая предварительная обработка может быть разделена на обработку грибами, бактериями (чистыми культурами), микробным консорциумом и ферментами (Wu et al., 2022). Принцип биологической предобработки основан на способности бактерий и грибов выделять внеклеточные ферменты (целлюлозолитические, лигнолитические, амилазные, пектинолитические, протеолитические, липолитические и др.) в окружающую среду и преобразовывать высокомолекулярные компоненты субстрата в более доступные соединения с меньшей массой. Биологическая предобработка подразумевает размножение организмов – продуцентов ферментов, поэтому необходимо учитывать условия выживания и роста (питательные вещества, ингибиторы, температура, концентрация кислорода, pH и другие) (Ferdes et al., 2020). Основными преимуществами биологической предобработки являются

низкое энергопотребление, простота и безопасность технологии, низкие капиталовложения (Zhang et al., 2011; Zhao et al., 2019).

Каждый способ предварительной обработки имеет собственный режим работы, а эффекты предварительной обработки часто дополняют друг друга, поэтому сочетание разных вариантов является эффективным и перспективным вариантом для улучшения параметров процесса (Grémond et al., 2018). Комбинация разных вариантов предварительной обработки позволит преодолеть недостатки технологии и повысить эффективность производства, сократит время процесса и уменьшит образование ингибиторов (Kumari, Singh, 2018).

2.2.2. Совместное сбраживание

Анаэробное совместное сбраживание (СС) является одновременным сбраживанием двух или более субстратов. Ключевыми параметрами процесса, влияющими на систему, являются характеристики ко-субстрата, ингибирование, вызываемое ко-субстратом и нагрузка по органическому веществу (Siddique, Wahid, 2018). Совместное сбраживание может увеличить производство биогаза от 25% до 400% по сравнению с моносбраживанием тех же субстратов (Nagos et al., 2017). При СС улучшение производства биогаза является результатом увеличения нагрузки по органическому веществу. Важным параметром процесса является соотношение ко-субстратов, способствующее равновесию макро- и микроэлементов, балансу влаги, разбавлению ингибирующих или токсичных соединений, оптимизации метанообразования и повышению стабильности эффлюента. Несмотря на влияние множества факторов на СС, основным параметром принято считать соотношение углерода к азоту (С:N), где оптимальные значения варьируются от 20 до 60 (Astals et al., 2014). Например, субстраты с более высоким соотношением С:N (>50) (рисовая и пшеничная солома, стебли кукурузы, водоросли) могут совместно сбраживаться с субстратами с более низким соотношением С:N (свиной навоз, птичий помет, пищевые отходы) (Rabii et al., 2019).

Неправильный выбор ко-субстратов и условий эксплуатации может привести к нестабильности процесса и значительному снижению образования метана (Xie et al., 2016). Основными преимуществами совместного сбраживания являются повышенная стабильность системы и выхода метана за счет синергетического эффекта более разнообразного микробного сообщества, лучший баланс питательных веществ, оптимальное соотношение углерода и азота (С:N), улучшенное соотношение микроэлементов, увеличенная буферная емкость системы, разбавление токсичных соединений, включая тяжелые металлы, безопасный и более качественный эффлюент для дальнейшего применения в сельском хозяйстве (Karki et al., 2021). СС существенно увеличивает экономическую эффективность АС в сравнении с моносбраживанием, за счет увеличения образования метана (Junior et al., 2021).

2.2.3. Добавки для улучшения АС

Применение различных добавок (неорганических и биологических) в системах АС является перспективным способом повышения производительности реакторов, стабильности процесса и выхода биогаза. Однако из-за неправильных концентраций добавок процесс АС может ингибироваться, что стоит учитывать при выборе дозировки. В качестве неорганических добавок используют макро- и микроэлементы, добавки различной природы, в том числе, стимулирующие ДИЕТ. В качестве биологических добавок рассматривают инокуляцию микробными культурами (биоаугментация) и внесение ферментов (Romero-Güiza et al., 2016; Ајау et al., 2020).

2.2.3.1. Макро- и микроэлементы

Для эффективного протекания процесса АС необходимо поддерживать уровень содержания основных макроэлементов, таких как углерод, азот, фосфор и сера, в необходимом количестве. Смешивание различной биомассы с разным составом помогает достичь приемлемого уровня содержания макроэлементов. Помимо необходимых макроэлементов, для АС требуются микроэлементы в относительно более низкой концентрации. Железо (Fe), никель (Ni), кобальт (Co), молибден (Mo), цинк (Zn), марганец (Mn), медь (Cu), селен (Se) и вольфрам (W) являются основными металлическими микроэлементами с рекомендуемой концентрацией от 1×10^{-6} до 1×10^{-15} М (Rasapoor et al., 2020). Избыточные концентрации некоторых макро- и микроэлементов могут привести к торможению процесса АС. Оптимальные концентрации значительно варьируются от одного исследования к другому, что связано с рядом факторов, включая: численность, структуру и периоды адаптации анаэробного сообщества; химическую форму металлов (зависит от pH, окислительно-восстановительного потенциала и присутствия хелатирующих соединений), меняющейся биодоступности для стимулирующих и ингибирующих целей; антагонистические и синергетические эффекты между элементами. Например, ингибирующими концентрациями для микроэлементов являются: $35 < Ni < 1600$; $35 < Co < 950$ и $12,5 < Cu < 350$ мг/л (Romero-Güiza et al., 2016). В качестве добавок микроэлементы необходимы для обеспечения стабильности процесса АС и увеличения производства биогаза. Микроэлементы являются важными кофакторами ферментов, участвующих в производстве CH_4 (Liu et al., 2021a). В литературе описано применение комбинации микроэлементов Fe, Co, Mo и Ni, приводящее к повышению выхода биогаза на 35,5%, а внесение смеси Co, Mo, Ni, Se и W увеличивало метанообразование в диапазоне 45–65%. Внесение макроэлементов S, N и P отдельно или в сочетании увеличивало метанообразование от 17% до 44%. Помимо внесения самих микроэлементов, можно использовать добавки, богатые микроэлементами, например внесение вермикулита, богатого P, увеличивало образование биогаза на 39,38% (Canan et al.,

2021). Положительное влияние микроэлементов на АС не является четко определённым и сильно зависит от многих факторов, таких как режим и условия работы, подаваемый субстрат, конфигурация реактора, общая концентрация фоновых элементов и т.д. Из-за сложности процесса АС воздействие каждого отдельного элемента сложно оценить. Добавление необходимых микроэлементов в (суб)оптимальной дозировке, безусловно, будет полезно для повышения эффективности АС благодаря важной роли и функциям (Choong et al., 2016).

2.2.3.2. Добавки, стимулирующие DIET

В настоящее время показано, что добавление в метаногенные биореакторы небиологических проводящих материалов, таких как гранулированный активированный уголь (ГАУ), биоуголь, карбоновая ткань, наночастицы железа, углеродные нанотрубки и т. д., может стимулировать DIET в микробном сообществе. Стимуляция DIET в процессе АС значительно улучшает кинетику метаногенеза, увеличивая скорость образования метана (Barua, Dhar, 2017). Внесение добавок, стимулирующих DIET, может легко решить проблемы, связанные с низкой эффективностью процесса АС, такие как медленная деградация органических отходов, плохая стабильность процесса, низкий выход биогаза, слабый синтрофический метаболизм и низкие концентрации переносчиков электронов (Abbas et al., 2021). Добавки, стимулирующие DIET при АС, разделяются на материалы на основе металла или углерода (Xie et al., 2020).

Материалы на основе углерода для стимуляции DIET

Материалы на основе углерода обладают большой удельной площадью поверхности, относительно однородной морфологией и развитой пористой структурой, что обуславливает применимость не только в процессах АС, но и в катализе, адсорбции, компостировании, восстановлении почв и т.д. Материалы на основе углерода повышают эффективность АС за счет установления прямого межвидового переноса электронов (DIET) и регуляции функциональных микроорганизмов из-за большой удельной поверхности и высокой проводимости (Zhang et al., 2023в). В качестве материалов на основе углерода для стимуляции DIET при АС используют: графен, оксид графена, карбоновую ткань и волокно, биочар/гидроочар, графит, гранулированный активированный уголь (ГАУ), углеродные нанотрубки, и т.д. Добавление материалов на основе углерода может повысить эффективность АС, однако необходимо учитывать оптимум концентраций для разных типов материалов в зависимости от условий процесса (Lu et al., 2020). Согласно литературным данным, некоторые углеродные проводящие материалы, такие как карбоновая ткань и ГАУ, могут стимулировать образование метана из сложного органического субстрата, обеспечивать более высокие значения нагрузки по органическому веществу и способствовать более быстрому восстановлению закисших реакторов. Закисление при АС происходит из-за кинетического дисбаланса между выработкой и скоростью потребления кислот, что приводит к резкому падению рН и нарушению буферной

емкости системы. Ранее указывалось, что метаногены очень чувствительны к изменениям pH и в основном могут жить в узком диапазоне pH от 6,5 до 7,2. Карбоновая ткань обогащалась видами родов *Sporanaerobacter* и *Enterococcus*, которые могут передавать электроны метаногенным археям рода *Methanosarcina*, что указывает на ускорение синтрофного метаболизма посредством DIET (Dang et al., 2016; Alavi-Borazjani et al., 2020). Согласно литературным данным, биочар и активированный уголь могут повышать эффективность АС пищевых отходов за счет уменьшения лаг-фазы и повышения устойчивости анаэробных микроорганизмов к кислой среде. Некоторые проводящие добавки, например активированный уголь, могут стимулировать размножение синтрофных микроорганизмов, в частности, рода *Geobacter* (Xie et al., 2020). Реакторы с добавлением биочара демонстрируют синтрофное разложение бутирата до ацетата при высоком парциальном давлении H_2 , что указывает на передачу электронов с помощью DIET, а не ПЕТ. Согласно литературным данным, реактор с добавлением графена с высокой проводимостью может поддерживать гораздо более высокий поток переноса электронов, чем реактор без графена, тем самым стимулируя DIET между микроорганизмами и повышая выход CH_4 (Liu et al., 2021b). Применение углеродных нанотрубок увеличивало скорость образования метана в два раза за счет DIET при АС в UASB реакторе. Однако не все углеродные материалы стимулируют АС посредством DIET, так, фуллерен, аллотроп углерода, не показал эффективного усиления процесса (Ajay et al., 2020).

Материалы на основе металлов для стимуляции DIET

Проводящие материалы усиливают DIET между метаногенами и микроорганизмами, окисляющими субстрат, заменяя собой e-пили или цитохромы c-типа. К материалам на основе металлов, стимулирующим прямой межвидовой перенос электронов, относятся магнетит (Fe_3O_4), гематит (Fe_2O_3), оксигидроксид железа, наночастицы нулевалентного железа, наночастицы оксида железа, нержавеющая сталь и т.д. (Wu et al., 2020). Внесение частиц магнетита в метаногенный ил повышало выход CH_4 из пропионата до 33% (Liu et al., 2021a). Внесение магнетита увеличивает микробное разнообразие в реакторе, в том числе метаногенных архей родов *Methanosarcina* и *Methanosaeta* (Paritosh et al., 2020). Проводимость гематита ниже, чем у магнетита, однако наблюдается схожее влияние на стимуляцию DIET. Гематит стимулирует DIET между представителями рода *Geobacter* и метаногенами. В АС сточных вод, содержащих бензоат, скорость деградации бензоата была увеличена на 25% в присутствии гематита ($\alpha-Fe_2O_3$) по сравнению с контролем (Zhu et al., 2020). Нулевалентное железо (ZVI) помимо стимуляции прямого межвидового переноса электронов снижает окислительно-восстановительный потенциал реакторов АС, создавая благоприятную среду для метаногенов, и стимулирует активность ферментов, участвующих в гидролизе и ацидогенезе. ZVI может увеличивать численность бактерий филума *Bacteroidota* и архей рода *Methanosaeta*.

Однако необходимо учитывать оптимальную концентрацию ZVI и размер частиц для эффективной стимуляции АС (Zhong et al., 2022). Согласно литературным данным, внесение нержавеющей стали в UASB реактор, питаемый ацетатной средой, богатой сульфатами, увеличивало образование метана в 4,5 раза по сравнению с контролем и обогащало прикрепленное сообщество представителями рода *Geobacter* (Barua, Dhar, 2017). К недостаткам применения материалов на основе металлов относится вымывание из реакторов, образование ионов, снижающих эффективность АС (ионы железа), слабая агрегация микроорганизмов с материалами. Одной из стратегий повышения эффективности и преодоления недостатков является комбинация соединений на основе металлов и углерода. Композиты на основе углерода и металлов обладают большой площадью поверхности, удобной для прикрепления микроорганизмов, и обогащены поверхностноактивными сайтами за счет металлических частиц, что позволит усилить DIET и эффективно применяться при АС (Liu et al., 2021б; Al Hasani et al., 2022).

2.2.3.3. Биологические добавки

Биологические добавки включают ферменты, улучшающие растворимость сырья, и микроорганизмы (бактерии и грибы), поскольку биоаугментация способствует увеличению производства биогаза (Cavali et al., 2022). Биоаугментация включает добавление специализированных микробных функциональных групп в систему АС, усиливая рост в неблагоприятных условиях. Чаще всего микроорганизмы для биоаугментации культивируют отдельно в определенных условиях для выполнения необходимой функции в системе (Lovato et al., 2021). В литературе отмечено позитивное влияние внесения представителей родов *Methanoculleus* и *Methanosarcina* при АС с высокими концентрациями аммония. Внесение *Methanobrevibacter* и синтрофных ацетатоокисляющих бактерий (CAO) (*Syntrophaceticus schinkii*) в виде микробного консорциума увеличило выход метана на 71% в системе с высокой концентрацией аммиака (Wang et al., 2023б). Согласно литературным данным, добавление *in situ* штамма *Clostridium* sp. PXYL1 в совместной культуре со штаммом *Methanosarcina* sp. PMET1 позволяло преодолеть ограничивающую скорость стадию метаногенеза в психрофильных условиях за счет ферментативной активности (Akindolire et al., 2022). Положительный эффект биоаугментации при АС навоза крупного рогатого скота был отмечен при обогащении сообщества термофильным целлюлозолитическим видом *Caldicellulosiruptor lactoaceticus*, производство метана возрастало на 10% в сравнении с контролем (Nzila, 2017). Недостатком применения биоаугментации являются высокие экономические затраты, в том числе дополнительные эксплуатационные расходы (Jiang et al., 2020). В качестве биологической добавки, ферменты стимулируют рост и активность микроорганизмов, делая биомассу более устойчивой к стрессовым воздействиям. Наиболее часто в качестве ферментов используют

целлюлазу и гемицеллюлазу, иногда протеазы, липазы и хитиназы. Активность ферментов зависит от многих факторов окружающей среды в зависимости от условий, в которых проводится реакция, включая температуру, ионную силу, pH, наличие ингибиторов и концентрацию фермента. Ферменты улучшают доступность субстратов для микроорганизмов, но стоимость ферментов высока, поэтому их применение ограничено (Mao et al., 2015; Fugol et al., 2023).

2.2.4. Оптимизация параметров АС

Одной из задач современных исследований является оптимизация различных параметров АС для увеличения выхода метана, улучшения экономических показателей. Основное внимание уделяется поиску оптимальных нагрузок по органическому веществу, количеству инокулята, соотношению углерода к азоту (C:N), скорости перемешивания и внесения микроэлементов для улучшения АС. Большинство исследований по оптимизации анаэробного сбраживания до сих пор были сосредоточены на оптимизации с одним или двумя параметрами, однако необходимо понимание влияния более широкого диапазона параметров на производство метана при АС (Adu-Gyamfi et al., 2012). Согласно литературным данным, методы моделирования позволят преодолеть недостатки АС за счет оптимизации параметров процесса. Модели АС используются для моделирования биологических и физико-химических реакций, обеспечивающих оптимальные условия работы и прогнозирующих конечные результаты. Их можно разделить на механистические и эмпирические модели. К механистическим моделям относят кинетическую модель анаэробного сбраживания № 1 (ADM1) и стехиометрические модели, основанные на росте микроорганизмов, преобразовании субстрата и производстве побочных продуктов. Механистические модели учитывают влияние таких параметров как ингибирующие соединения, pH и температура. Эмпирические модели основаны на наблюдениях, записях данных или измерениях и включают методологию поверхности отклика, нейронные сети, статистические модели и вычислительную гидродинамику (Blumensaat, Keller, 2005; Rocha-Meneses et al., 2022)

В целом, для эффективного протекания АС различных субстратов необходимо комбинировать различные методы и технологии оптимизации процесса, повышая экономическую привлекательность и перспективность для масштабирования технологии. Поэтому целью исследования была оптимизация наиболее существенных параметров процесса АС и отслеживание состояния микробного сообщества, способного осуществлять DIET, с помощью комплекса методов.

РАЗДЕЛ 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Глава 3. Объекты и методы исследования, постановка экспериментов

3.1. Инокуляты

В качестве инокулятов использовали термофильно сброженный (55°C) навоз крупного рогатого скота (КРС, Ленинградская область, Россия), термофильно сброженный (55°C) осадок сточных вод (ОСВ, Череповецкий водоканал, Россия), а также смесь первичного и вторичного ОСВ в соотношении 1:1 Люберецких очистных сооружений (г. Москва) и термофильно (52°C) сброженный навоз крупного рогатого скота (КРС), обогащенный синтрофными и электроактивными микроорганизмами путем прединкубации со смесью ЛЖК в концентрации 40 мМ (масляная кислота и пропионовая кислота в соотношении 1,2:1,0), с добавлением гранулированного активированного угля (ГАУ) в концентрации 5 или 10 г/л и магнетита с концентрацией 5 или 10 г/л (Таблица 4).

Таблица 4. Характеристика инокулятов (СВ – сухое вещество, ОВ – органическое вещество).

Инокулят	СВ, %	ОВ, %
Смесь первичного и вторичного ОСВ	1,30	83,67
Термофильно сброженный КРС	5,46	3,9
Термофильно сброженный ОСВ	8,22	3,04
Термофильно сброженный КРС, обогащенный синтрофными и электроактивными микроорганизмами	3,3	1,82

3.2. Субстраты

В качестве субстратов в разных вариантах опыта использовали:

1. Сток свиного комплекса (сток) и свиной навоз (навоз) (АО «Рязанский свиного комплекс», Россия) (Таблица 5).
2. Синтетическую смесь солей летучих жирных кислот: уксусной ($C_2H_3O_2Na$), пропионовой ($C_3H_5NaO_2$) и масляной кислот ($C_4H_7NaO_2$) в концентрации 12,5 г/л в соотношении 4:2:1, соответственно 121 мМ ацетата, 49 мМ пропионата, 21 мМ бутирата.
3. ОСВ Люберецких очистных сооружений и модель ОФ-ТКО. В качестве модели ОФ-ТКО для обеспечения его постоянного состава в ходе эксперимента в реакторе непрерывного действия использовался комбикорм для крупного рогатого скота К-65 (Таблица 6, Ножевникова и др., 2016). Для получения необходимой концентрации ОВ и влажности, субстратную смесь разбавляли требуемым количеством водопроводной воды.
4. Органическую фракцию ТКО в виде модельной смеси, которая имеет типичные для таких отходов пищевые и лигноцеллюлозные компоненты (Ножевникова и др., 2016)

(Таблица 7). ОФ-ТКО имела следующие характеристики: СВ – 0,315 г/г; ОВ – 0,288 г/г;
Влажность – 68,5 %.

Таблица 5. Характеристика свиного навоза и стока свиного комплекса, использованных в качестве субстратов.

Параметр	Свиной навоз	Сток свиного комплекса
СВ, %	16,1	0,84
С, %СВ	46	36
Н, %СВ	6,1	5,4
N, %СВ	1,76	3,7
S, %СВ	<0,3	1,06
C:N	26,1:1	9,7:1
Белки, %СВ	8,81	Н.и.*
Жиры, %СВ	9,46	Н.и.*
Клетчатка, %	2,71	Н.и.*
Клетчатка, %СВ	21,52	Н.и.*
К, %	0,048	0,042
Са, %	0,14	0,031
Fe, %	0,0086	0,0019
Сu, %	0,0042	0,0008
Ni, %	0,00011	$<1 \times 10^{-6}$
Zn, %	0,01	0,0016
Со, %	$<5 \times 10^{-5}$	$<5 \times 10^{-5}$
P, %	0,055	0,015
Cr, %	5×10^{-5}	3×10^{-5}
Hg, %	$<5 \times 10^{-5}$	$<5 \times 10^{-5}$
ХПК общий, мг O ₂ /л	Н.и.*	4800
NH ₄ ⁺ , мг/л	Н.и.*	647,6

Примечание: *Н.и. – не измеряли.

Таблица 6. Характеристика ОСВ Люберецких очистных сооружений и модельной смеси ОФ-ТКО.

Образец	ОСВ	Модель ОФ-ТКО (Комбикорм К-65)
СВ, %	1,30	90,23
ОВ/СВ, %	64,36	92,44
Сырой жир, %СВ	2,30	1,99
Сырой протеин, % СВ	20,72	16,67
Доля общего сахара в пробе в %, выраженная в глюкозе	13	40,2
Клетчатка, % СВ	8,05	7,48

Таблица 7. Состав модельной ОФ-ТКО, использованной в работе.

Компонент ОФ-ТКО	% масс.
Картофель	12,5
Капуста	12,5
Яблоки	5
Апельсины	5
Бананы	5
Мясо фарш	2,5
Хлеб	5
Творог	1
Яйцо куриное	0,5
Бумага	5
Ветошь (ткань, вата)	5
Щепа и стружка древесная	40

Исходные компоненты пищевых отходов подвергали физической предобработке с использованием гомогенизатора. Далее к гомогенизированной смеси добавляли лигноцеллюлозные отходы, которые придавали пористость смеси ОФ-ТКО, что важно для технологии твердофазного анаэробного сбраживания.

3.3. Материалы-носители

В качестве материалов носителей использовали электропроводящую карбоновую ткань (твил 2/2 ЗК-1000-200, carbocarbo, Китай), карбоновый войлок (ZLWMQMD 001 store, Китай) и сетку из нержавеющей стали (12X18Н9, Россия), ГАУ в дозировке 10 и 20 г на флакон (33,3 или 66,6 г/кг) (активированный уголь кокосовый, влажность – 4%, Китай) и магнетит ($Fe_2O_3 + FeO$, чистый >99,0%, СТП ТУ КОМП 2-253-10, Компонент реактив, Россия). В качестве инертных (неэлектропроводящих) материалов использовали стекловолокно (конструкционное

стекловолокно T-13, carbocarbo, Китай), полиэфирный войлок (АО «МОНТЕМ», Россия), сетку из стекловолокна (Phifer micro mash, США) и диатомит (крошка обожжённая, Россия) (Таблица 8).

Таблица 8. Характеристика материалов носителей.

Материал	Площадь поверхности BET (Brunauer, Emmett and Teller) м ² /г	Дозировка
Электропроводящие материалы		
Карбоновая ткань	0,3015	0,487 м ²
Карбоновый войлок	0,4259	0,014 м ²
Сетка из нержавеющей стали	0,001963	0,021 м ²
ГАУ	772,42	10 и 20 г
Магнетит	21,83	10 и 20 г
Неэлектропроводящие материалы		
Конструкционное стекловолокно	0,2613	0,487 м ²
Полиэфирный войлок	0,0536	0,014 м ²
Сетка из стекловолокна	0,003526	0,021 м ²
Диатомит	4,51	21,45 г

Стекловолокно, войлоки и ткань предварительно замачивали в смеси этанола и ацетона (1:1) с последующей двукратной отмывкой в дистиллированной воде, после чего высушивали при температуре 48°С в течение 24 часов.

3.4. Постановка экспериментов

Для определения эффективности стимуляции DIET в разных типах АС (по влажности субстрата, нагрузке по органическому веществу, режиму подачи субстрата) были поставлены соответствующие эксперименты.

3.4.1. Изучение влияния 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 (Эксперимент 1)

Эксперименты по анаэробному сбраживанию проводили в стеклянных флаконах объемом 265 мл. На первом этапе эксперимента, длившемся 18 суток, в качестве субстрата использовали смесь из 80,0 г стока и 15,45 г навоза (Таблица 5). Масса добавленного инокулята составила 80 и 67,5 г для ОСВ и КРС (Таблица 4), соответственно. Во флаконы вносили

электропроводящие материалы и их инертные аналоги. Дозировка сеток (стальной и из стекловолокна) для одного флакона составляла 7 кусков размером 7×4,2 см каждый, с общей площадью 205,8 см², а войлоков (карбонового и полиэфирного) – 10 кусков размером 7×2 см каждый, с общей площадью 140 см². Объем жидкой фазы доводили до 200 мл водопроводной водой. После окончания первого этапа эксперимента во флаконы добавляли дополнительно 35,0 г навоза (второй этап эксперимента, длился 20 суток) (Таблица 9). В ходе третьего этапа эксперимента, длившемся 40 дней, в стеклянные флаконы вносили смесь ЛЖК в конечной концентрации 12,5 г/л. После внесения всех компонентов, флаконы тщательно продували азотом для создания анаэробных условий и закрывали резиновой пробкой. Резиновые пробки протыкали толстой медицинской иглой сквозь ребро жесткости, к основанию иглы присоединяли 0,5 л мешок с металлизированной поверхностью (E-Switch, Китай) для сбора образующегося биогаза. Флаконы инкубировали в темноте без перемешивания при 55 °С. Все эксперименты проводили в двух повторностях.

Таблица 9. Схема постановки двух этапов эксперимента 1.

Обозначение флаконов	Инокулят	Материал	1 этап				2 этап			
			СВ смес и, г/г	ОВ смес и, %	НН ₄ смес и, мг/л	ХПКра ств. смеси, мг О ₂ /л	СВ смеси, %	ОВ смеси, %	НН ₄ смес и, мг/л	ХПКра ств. смеси, мг О ₂ /л
ОСВ-К	ОСВ	-	0,039	0,018	1896	4450	0,050	0,030	1209	3460
ОСВ-КВ	ОСВ	Карбоновый войлок	0,043	0,020	1893	4510	0,051	0,031	1270	3390
ОСВ-ПВ	ОСВ	Полиэфирный войлок	0,042	0,020	1782	3710	0,049	0,030	1369	3130
ОСВ-НС	ОСВ	Нержавеющая сталь	0,040	0,018	1963	3980	0,044	0,024	1005	3160
ОСВ-СС	ОСВ	Сетка из стекловолокна	0,040	0,018	2433	4610	0,047	0,028	963,4	3450

КРС-К	КРС	-	0,026	0,019	2082	5710	0,032	0,025	1549	4880
КРС-КВ	КРС	Карбоновый войлок	0,025	0,018	1990	6040	0,037	0,030	1229	5080
КРС-ПВ	КРС	Полиэфирный войлок	0,027	0,020	2656	5520	0,035	0,028	829,4	4940
КРС-НС	КРС	Нержавеющая сталь	0,026	0,019	2213	5520	0,030	0,023	1458	5090
КРС-СС	КРС	Сетка из стекловолокна	0,027	0,020	1737	6320	0,029	0,025	1295	4880

3.4.2. Изучение влияния электропроводящей карбоновой ткани и инертной ткани из стекловолокна на характеристики совместного анаэробного сбраживания при высокой нагрузке по органическому веществу (Эксперимент 2)

Экспериментальные исследования проводили на испытательном стенде, включающем в себя 3 одинаковых цилиндрических биореактора (R1, R2, R3) объемом 90 л каждый (диаметр 460 мм, высота 550 мм) из нержавеющей стали AISI 321 с плоским дном. Температуру в реакторах поддерживали на постоянном уровне $55,1 \pm 0,5^\circ\text{C}$ с помощью ленточного нагревательного элемента. R1 использовали в качестве контрольного реактора, без материала. Контрольный реактор R2 содержал в качестве материала неэлектропроводящее стекловолокно. Экспериментальный реактор R3 содержал электропроводящую карбоновую ткань. Материалы крепились к поверхности цилиндрических емкостей (труб) из полипропилена. Наружная труба (диаметр 200 мм, высота 500 мм) выполнена без дна и прикреплена к крышке реактора; внутренняя труба (диаметр 110 мм, высота 450 мм) выполнена без крышки и прикреплена к днищу реактора (Рисунок 5). Материалы, прикрепленные к внешней и внутренней трубам, имели площадь 0,314 и 0,173 м², соответственно; таким образом, общая площадь материалов как в R2, так и в R3 составила 0,487 м². Расстояние между поверхностями труб составляло около 45 мм. Для попеременного движения субстрата пара труб была установлена соосно. Непрерывное перемешивание в реакторе осуществляли путем рециркуляции субстрата перистальтическим насосом НП-16 (ТехСовет, Россия) с расходом 3,8 л/мин. Шлам перемещался из верхней части реакторного пространства во внутреннюю полость внутренней трубы и проходил через пространство между наружной и внутренней трубами в основное

реакторное пространство. Анаэробные биореакторы выводили на рабочий режим, используя в качестве субстрата и инокулята ОСВ (Таблица 6). Выход на рабочий режим оценивался стабильностью выхода биогаза, содержанием метана в биогазе и характеристиками эффлюента. После этого 71 день в биореакторы грузили одинаковую для всех реакторов субстратную смесь ОСВ, ОФ-ТКО и водопроводной воды (Таблица 10). Эксперимент состоял из 4-х основных стадий, в ходе которых в биореакторах постепенно повышали нагрузку по органическому веществу со средней для подобных биореакторов нагрузки 2,4 кг ОВ/(м³ сутки) до высокой нагрузки 12,12 кг ОВ/(м³ сутки).

Таблица 10. Характеристика состава смеси субстратов для разных ступеней эксперимента.

Этап	Сутки	Нагрузка по органическому веществу, кг ОВ/(м ³ сутки)	HRT сутки	Содержание ОВ в смеси, кг ОВ/м ³	Состав смеси
1	1-20	2,4	7	17,1	1 л ОСВ + 0,08 кг ОФ-ТКО + 4 л воды
2	21-35	4,42	7	31,9	1 л ОСВ + 0,06 кг ОФ-ТКО + 1 л воды
3	36-55	8,66	7	63,8	1 л ОСВ + 0,216 кг ОФ-ТКО + 2 л воды
4	56-71	12,12	5	63,8	1 л ОСВ + 0,216 кг ОФ-ТКО + 2 л воды

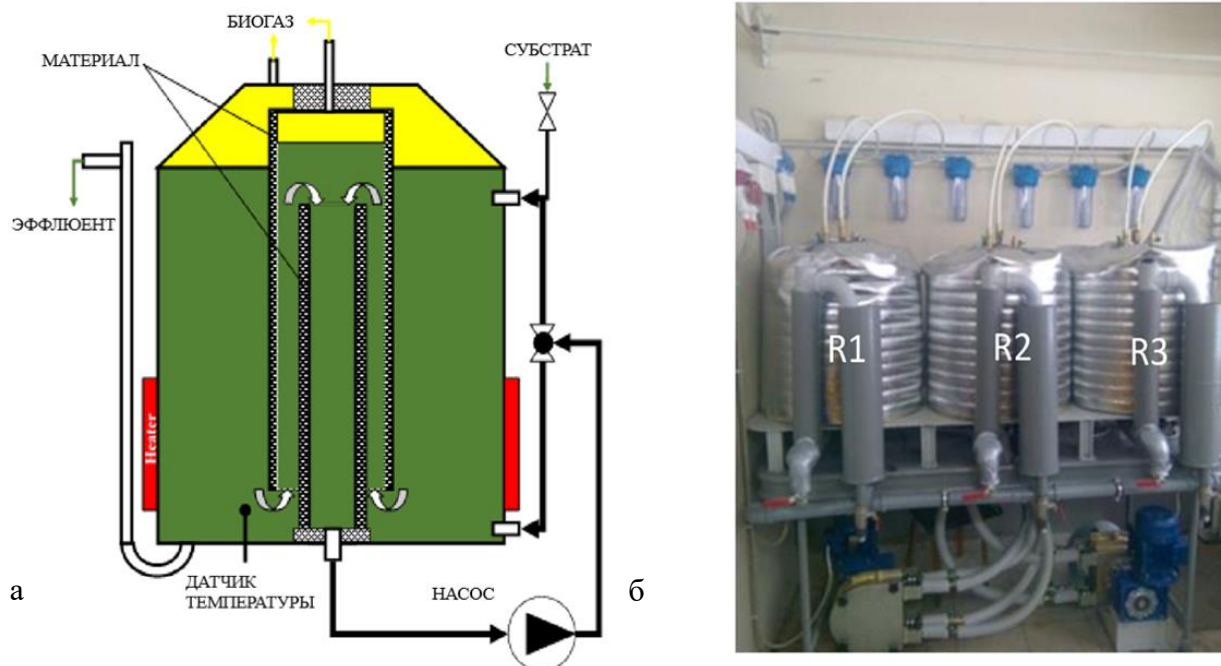


Рисунок 5. Схема одного из 3-х анаэробных биореакторов объемом 90 л (а) и общий вид стенда (б): R1-контроль; R2-стеклоткань; R3-карбоновая ткань.

3.4.3. Изучение влияния разных количеств электропроводящего материала - гранулированного активированного угля (ГАУ) и магнетита, на скорость метанообразования и разложения ЛЖК при твердофазном анаэробном сбраживании (Эсперимент 3)

В соответствии с принципиальной схемой эксперимента (Рисунок 6а), в стеклянный флакон объемом 500 мл вносили электропроводящий материал: магнетит (Маг) либо ГАУ по 10 или 20 г (33,3 или 66,6 г/кг). После электропроводящего материала во флакон вносили слой диатомита, массой $21,45 \pm 0,07$ г, затем добавляли субстрат – модельную смесь ОФ-ТКО массой $143,48 \pm 2,29$ г и инокулят массой $156,32 \pm 4,90$ г. ОВ смеси субстрата и инокулята составила 0,147 г/г, СВ – 0,167 г/г, а влажность – 83,3%. Разделительный слой диатомита создавал во флаконе зоны для наиболее благоприятного развития гидролитических/броидильных микроорганизмов в верхнем слое, и синтрофных и электроактивных бактерий/метаногенов в нижнем слое. В контрольных образцах не добавляли диатомит и кондуктивные материалы (K1), либо добавлялся только диатомит (K2). Флаконы продували аргоном и герметично закрывали резиновыми пробками для создания анаэробных условий. Резиновые пробки прокалывали толстой медицинской иглой и к основанию иглы присоединяли 0,5 л мешок с металлизированной поверхностью (E-Switch, Китай) для сбора образующегося биогаза.

Флаконы инкубировали без перемешивания при температуре 52°C. Все эксперименты проводили в двух повторностях. Время инкубации составило 43 дня.

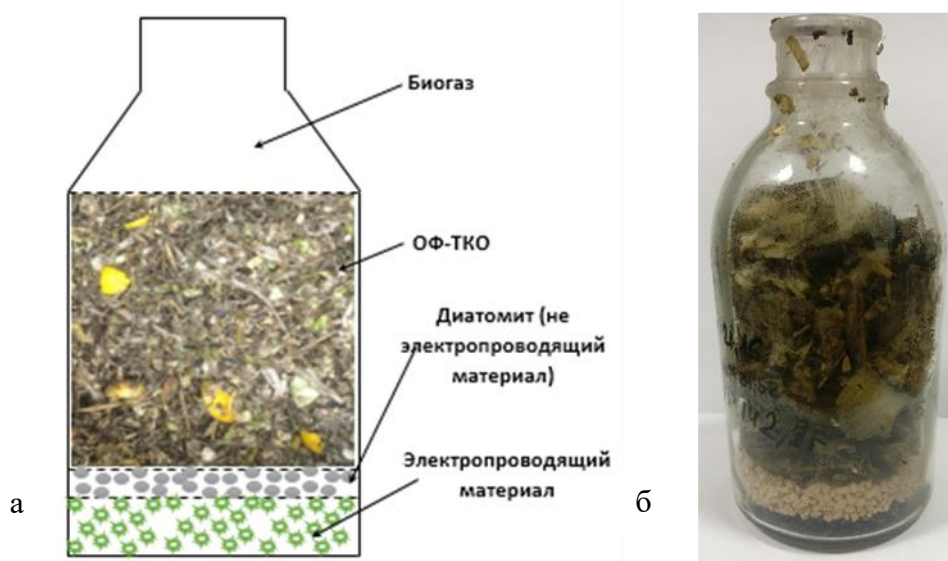


Рисунок 6. Принципиальная схема (а) и общий вид (б) экспериментальной установки по твердофазному анаэробному сбраживанию ОФ-ТКО.

3.5. Определение кинетических параметров метаногенеза

Для определения кинетических параметров метаногенеза экспериментальные данные производства метана вносили в модифицированное уравнение Гомперца (МУГ) (Уравнение 1) и уравнение первого порядка (УПП) (Уравнение 2). МУГ предполагает, что образование CH_4 есть функция роста микроорганизмов метаногенного сообщества и обозначает совокупное производство метана в периодических условиях:

$$P_{\text{УГ}} = \gamma \exp\left(-\exp\left(\frac{K(\lambda-t)e^1}{\gamma} + 1\right)\right) \quad (1)$$

где $P_{\text{УГ}}$ – кумулятивное производство метана (мл/г ОВ) за время t , γ – потенциальный выход метана (мл/г ОВ), K – максимальная скорость выхода метана (мл/(г ОВ сутки)), λ – продолжительность лаг-фазы (сутки), t – время, при котором рассчитывается кумулятивный выход метана (сутки).

Для определения константы скорости процесса было использовано уравнение первого порядка (УПП):

$$P_{\text{УПП}} = P_{\text{макс}}(1 - \exp(-kt)) \quad (2)$$

где $P_{\text{УПП}}$ – кумулятивное производство метана (мл/г ОВ) за время анаэробного сбраживания t , $P_{\text{макс}}$ – максимальный выход метана (мл/г ОВ), k – константа гидролиза (сутки⁻¹).

Расчет кинетических параметров проводили в программе MS-Excel с помощью надстройки Solver. Коэффициент детерминации R^2 рассчитывали для определения качества уравнения регрессии и достоверности полученных констант.

3.6. Аналитические методы

Анализ газовой фазы (водород, углекислый газ, метан) проводили на газовом хроматографе Кристалл 5000.2 с детектором GC-FID (пламенно-ионизационный) и сорбентами NaX и Na₂SeP N 80/100 (Хроматек, Россия). 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 анализируемой пробы составлял 0,5 мл. Для определения содержания СВ образец высушивали при 105°C до постоянной массы. Для определения зольного остатка сухой образец сжигали при 650°C в муфельной печи до постоянной массы. Содержание ОВ определяли, как разницу между СВ и зольным остатком. Для определения уровня рН использовали рН-метр FE20, оснащенный микроэлектродом InLab® (оба Mettler Toledo, Швейцария). Химическое потребление кислорода (ХПК) определяли на спектрофотометре DR5000 с использованием кюветного теста LCK 514 (оба Hach Lange GmbH, Германия). Характеристики пористой структуры образцов материала были изучены методом измерения низкотемпературной адсорбции азота. Удельную поверхность материалов оценивали методом BET. Элементный состав CHNS(O) определяли с использованием элементного анализатора Elementar Vario EL cube (Elementar Analysensysteme GmbH, Германия). Содержание тяжелых металлов и фосфора определяли с использованием атомно-эмиссионного спектрометра с индуктивно-связанной плазмой Prodigy High Dispersion ICP (Teledyne Leeman Labs., США). Стандартные методы использовали для определения содержания белков, жиров и клетчатки (АОАС, 2000).

Концентрацию NH_4^+ измеряли с использованием системы капиллярного электрофореза Капель-205 (Люмэкс, Россия). Идентификацию и количественное определение проводили путем непрямого обнаружения измерением УФ-поглощения при 254 нм. Электрофорез проводили в необработанном капилляре из плавленого кварца длиной 60 см (эффективная длина 50 см) и внутренним диаметром 75 мкм. Для анализа использовался фоновый электролит на основе бензимидазола и винной кислоты с добавкой 18-краун-6. В капилляре поддерживалась температура 20°C, прикладываемое напряжение составляло +13 кВ. Этанол и летучие жирные кислоты (ЛЖК) (уксусная, пропионовая, *n*- и изо-масляная, *n*- и изо-валериановая) в жидких пробах определяли на газо-жидкостном хроматографе Кристалл 5000.2, колонка Solgel-Wax (30 м, 0.25 мм, 0.25 мкм) (Хроматек, Россия). Температура колонки увеличивалась от 130°C до 180°C со скоростью 10°C/мин; температура испарителя составила 220°C, детектора ПИД –

230°C; скорость потока газа-носителя (гелий) была 1 мл/мин. Образцы предварительно центрифугировали со скоростью 10000 об/мин в течение 5 мин и доводили с помощью муравьиной кислоты до pH=2,5-3,0. Калибровку хроматографа и количественное определение этанола и ЛЖК осуществляли с применением внутреннего стандарта 2-этилмасляной кислоты (99%, Sigma-Aldrich). Для определения суммарной концентрации летучих жирных кислот (г/л) суммировали концентрации каждой отдельной кислоты, пересчитанной в эквивалентах $\text{C}_n\text{H}_{2n}\text{COOH}$ с учетом коэффициента пересчета. Коэффициенты пересчета для уксусной, пропионовой, n-/изомасляной, n-/изовалериановой кислоты равны 1,00; 0,81; 0,68 и 0,59, соответственно.

3.7. Микроскопия

Изучение морфологии микробных обрастаний на электропроводящих материалах и их инертных аналогах проводили с использованием сканирующей электронной и лазерной конфокальной сканирующей микроскопии.

3.7.1. Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ)

Для получения изображения роста биопленки небольшие кусочки каждого образца дважды промывали фосфатным буфером (pH 7,0) и обезвоживали в растворах этилового спирта возрастающей концентрации (от 15 до 100%). Затем образцы дважды промывали 100%-ным 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).

3.7.2. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия (КЛСМ)

Пробы отмывали дистиллятом от планктонных клеток для наблюдения биопленок, затем хранили в 96% спиртовом растворе. Перед началом наблюдения образцы промывали фосфатно-солевым буфером от спирта с использованием центрифуги на 3 тысячах оборотов в течение двух минут. Затем к образцам добавляли лектин ConA, конъюгированный с флуоресцентным красителем Alexa Fluor 488 (C11252 ThermoFisher) в фосфатном буфере с разведением 1:500. ConA связывался с моносахаридами стенок микроорганизмов и экзополисахаридами (ЭПС). Помимо этого, был использован флуоресцентный краситель SYBR Green II, связывающийся с нуклеиновыми кислотами (НК) (преимущественно с РНК), разведенный в фосфатном буфере 1:1000. Оба красителя были совместно добавлены к пробам в объеме 70 мкл, чтобы они покрывали исследуемый материал. Окрашивание проводили в течение 30 минут при комнатной температуре в темноте на качалке. Затем образцы отмывали фосфатным буфером 3 раза по 5 минут и анализировали с помощью конфокального микроскопа Zeiss LSM880 (Zeiss, Германия).

Изображение получали на объективе $\times 40$ с использованием аргонового лазера с длиной волны 488 нм (для детекции флуоресценции ConA) и длиной волны 543 (для детекции Sybr Green), а также методом контраста Номарского для детекции неокрашенных частиц (волокон войлока). Полученные изображения анализировали с помощью программного пакета ImageJ с плагином BioFormats 5.8.2, BioFilmAnalyzer v.1.0 (Bogachev et al., 2018) Imaris 7.4.2. (Bitplane, Швейцария) и COMSTAT 2.1 (Denmark) (Heydorn et al., 2000; Vorregaard et al., 2008) использовали для 3D-визуализации и анализа цифровых изображений, отражающих количество присутствующей биомассы, вместе с измерением толщины биопленки. Для характеристики структуры биопленки определяли общую биомассу (ЭПС и клеток), толщину, коэффициент шероховатости и отношение поверхности к биообъему. Общая биомасса (биообъем) была рассчитана на основе двух основных компонентов биопленки – клеток и ЭПС, выявленных окрашиванием флуоресцентными красителями – SYBR green и ConA.

3.8. 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 с использованием набора MiSeq Reagent Kit v2 (500 циклов) (Illumina, США) (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).

3.9. Статистические и биоинформатические методы

Для обработки результатов исследования использовали стандартные библиотеки для анализа и визуализации данных на языке Python 3.0: numpy, pandas, matplotlib, seaborn. Проверка статистических гипотез осуществлялась на базе библиотеки scipy с использованием методов scipy.stats.kruskal и scikit_posthocs.posthoc_mannwhitney. 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. Уровень значимости α принят за 0,05. Для реакторов, значимо

отличающихся друг от друга, наряду с p -значениями представлены медианные доверительные интервалы различий в абсолютной, а также в относительной величинах. Тепловые карты были сделаны с использованием пакета ComplexHeatmap [https://academic.oup.com/bioinformatics/article/32/18/2847/1743594] (версия 2.11.2) для языка R (версия 4.1.2) в DataSpell IDE (Build # ДС-221.5080.210). Коррелограмма была построена с использованием пакета corrplot (Wei T, Simko V (2021). Пакет R 'corrplot': Визуализация матрицы корреляции (Версия 0.92), [https://github.com/taiyun/corrplot] для языка R (версия 4.1.2) в DataSpell IDE (сборка № DS-221.5080.210). Матрица корреляции вычислялась с помощью функции «cor» (пакет «stats», часть R). Поскольку многие переменные имеют ненормальное распределение, коэффициенты корреляции рассчитывали с использованием ранговой корреляции Спирмена (cor(method='spearman')). Проверка значимости выполнялась функцией «cor.mtest» (пакет «corrplot»). Статистический анализ и визуализация данных (графики RDA (анализ избыточности), тепловые карты с дендрограммами и тройными диаграммами) были подготовлены в RStudio v. 1.4.1717 с использованием языка R v. 4.0. Для графиков RDA было выполнено преобразование Хеллингера, и графики были созданы с использованием пакета vegan 2.5-7 [https://cran.r-project.org/web/packages/vegan/vegan.pdf]. Тепловые карты построены в пакете ComplexHeatmap 2.8.0 [https://www.biconductor.org/packages/release/bioc/html/ComplexHeatmap.html], для дендрограмм — в пакете Taxonomy ape 5.6–1 [https://cran.rproject.org/web/packages/ape/index.html]. Тройные диаграммы были построены с помощью пакета ggtern 3.3.5 [https://cran.r-project.org/web/packages/ggtern/index.html]. Тест Mantel был выполнен с использованием встроенной функции mantel в R, а координаты из графика RDA комбинаций материала/посевого материала были преобразованы в расстояния с использованием пакета geosphere 1.5-14 [https://cran.r-project.org/web/packages/geosphere/geosphere.pdf] и метода Спирмена. Кинетические параметры AC были преобразованы в расстояния с использованием метода Евклида. Статистическую обработку и графическую визуализацию полученных результатов также проводили в программе Microsoft Excel 2013 и OriginPro 2022 v.9.9.0.225, достоверность различий полученных результатов оценивали с помощью коэффициента Стьюдента ($p < 0,05$). Индексы разнообразия рассчитывали по OTE, полученным после секвенирования 16S рРНК в базе данных SILVAngs с помощью программного обеспечения PAST, версия 4.06b (Hammer O, Harper DAT, Ryan PD (2001) PAST: Пакет программного обеспечения для палеонтологической статистики для обучения и анализа данных Palaeontol Electron 4:e9 [http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm]).

РАЗДЕЛ 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ²

Глава 4. 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 (Эксперимент 1)

В данной главе исследовалось влияние электропроводящих и инертных материалов на процесс АС низкоконцентрированных отходов, что ранее, согласно анализу мировой литературы, не изучалось и смеси летучих жирных кислот в высокой концентрации.

4.1. Характеристика анаэробного сбраживания

4.1.1. Образование метана, кинетические параметры метаногенеза

Динамика накопления метана является одним из важных параметров для оценки эффективности процесса анаэробного сбраживания. В ходе эксперимента на первом этапе при использовании ОСВ в качестве инокулята было отмечено позитивное влияние полиэфирного (ОСВ-ПВ) и карбонового войлоков (ОСВ-КВ) на динамику накопления метана. В то же время разница между ними была незначительной, кумулятивный выход метана в конце первого этапа эксперимента составлял 805,0 и 793,4 мл, соответственно (Рисунок 7 а). 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 7 б). После увеличения на втором этапе концентрации ОВ смеси до ~27 г/л за счет внесения богатого органикой свиного навоза, при использовании ОСВ в качестве инокулята, наибольшее количество метана (1446,4 мл) образовалось во флаконах с полиэфирным войлоком (ОСВ-ПВ) (Рисунок 7 в), аналогично первому этапу. В то же время при применении карбонового войлока (ОСВ-КВ) количество накопленного метана было меньше и составляло 1152,2 мл (Рисунок 7 в).

² Основные результаты, изложенные в данной главе, опубликованы в следующих научных статьях автора в журналах, индексируемых в базах данных WoS, Scopus и RSCI, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В. Ломоносова:

1. **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)
2. **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)
3. 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)

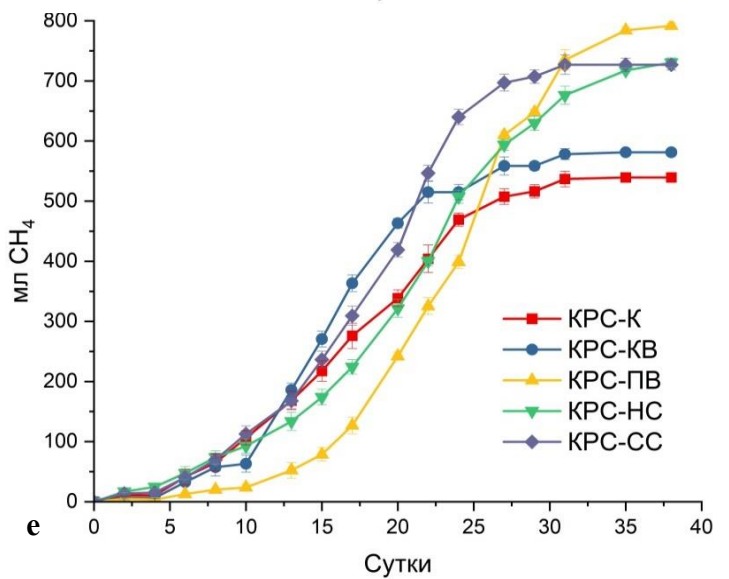
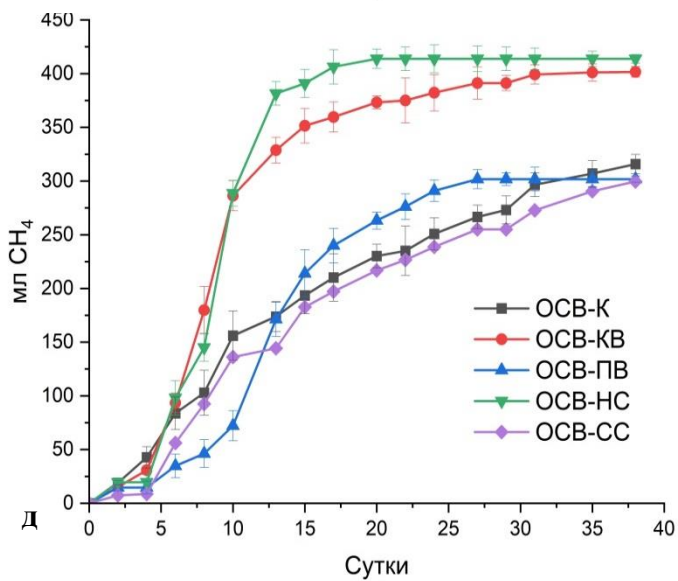
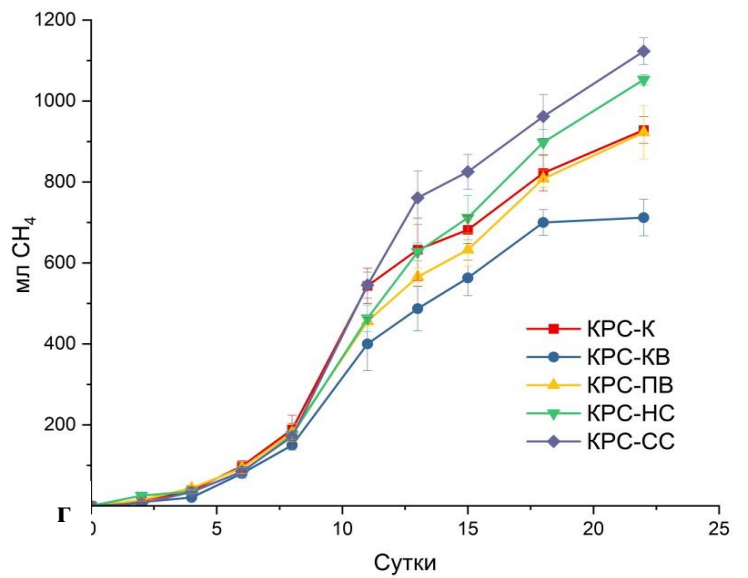
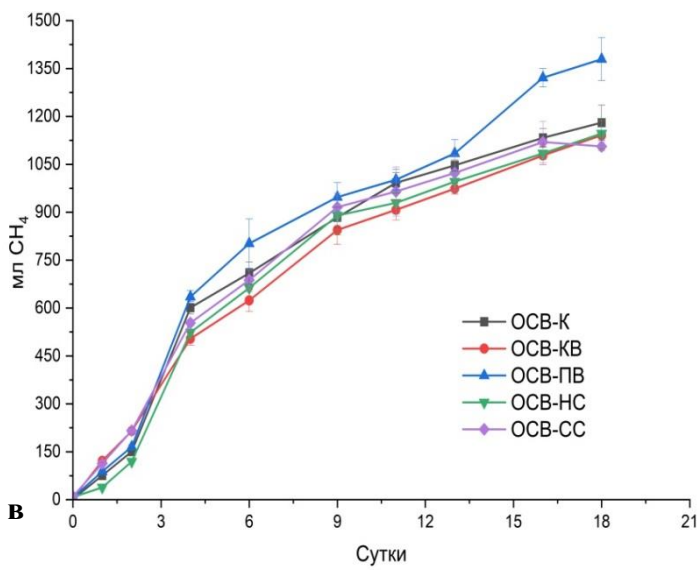
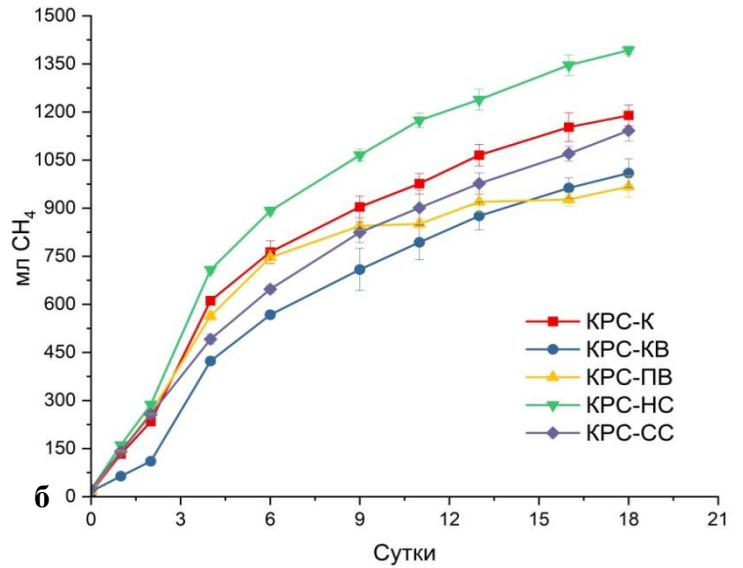
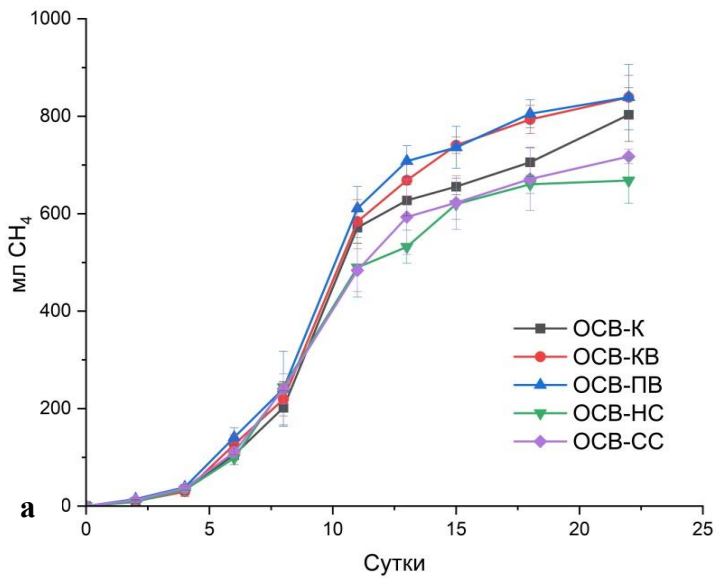


Рисунок 7. Динамика образования метана при анаэробном сбраживании комплексного отхода свинофермы с ОСВ и КРС в качестве инокулята на первом (а, б) и втором (в, г) и третьем (д, е) этапах эксперимента.

При использовании КРС в качестве инокулята динамика накопления метана отличалась. В частности, больше всего метана образовалось во флаконах с нержавеющей сталью (КРС-НС) в качестве носителя – 1412,1 мл (Рисунок 7 г), причем это значение было значительно выше, чем 1204,7 мл CH_4 во флаконах с сеткой из стекловолокна (КРС-СС) (Рисунок 7 г). В ходе третьего этапа эксперимента во флаконах с ОСВ в качестве инокулята отмечено позитивное влияние карбонового войлока (ОСВ-КВ) и сетки из нержавеющей стали (ОСВ-НС) на динамику накопления метана (Рисунок 7 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 CH_4). Кумулятивный выход CH_4 для ОСВ-ПВ и ОСВ-СС был равен 301,8 и 299,6 мл и незначительно отличался от ОСВ-К (на 4,4% и 5,1%). 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 CH_4 , соответственно, что на 46,7%, 35,4% и 34,7% больше по сравнению с контролем КРС-К - 539,6 мл (Рисунок 7 е). Самый низкий кумулятивный выход метана был у флаконов с карбоновым войлоком (581,3 мл) разница с контролем составила всего 7%.

Основные кинетические константы производства метана для процесса АС комплексного отхода свинофермы (смесь сточных вод и навоза) на первом этапе эксперимента посчитаны согласно МУГ (Уравнение 1) и УПП (Уравнение 2) (Таблица 11), для второго этапа (Таблица 12). Так как продолжительность АС считается одним из ключевых показателей биоразлагаемости и скорости переработки органических отходов, дополнительно оценивали общую продолжительность процесса анаэробного сбраживания. Поскольку кривая кумулятивного производства CH_4 только асимптотически приближается к его максимально возможному выходу, потребовалось бы бесконечное время для получения 100% метанового потенциала из органического отхода. 75-90% от потенциального выхода метана (согласно тестам биохимического метанового потенциала, ВМР) наблюдается в полномасштабных анаэробных реакторах в зависимости от режима АС (Holliger et al., 2017). В качестве параметра для оценки общей продолжительности процесса мы использовали нижнюю оценку, то есть время, необходимое для получения 75% потенциального выхода метана ($T_{75\%}$). Общую продолжительность процесса АС, полученную в периодическом режиме, можно использовать для оценки гидравлического времени удержания (ГВУ) и времени пребывания сухого вещества (SRT) для анаэробных реакторов, работающих в непрерывном режиме. Также параметр $T_{75\%}$ может быть использован как индикатор для прогнозирования эффективности биоконверсии органического вещества в биогаз, скорости образования и удельного выхода метана. Если вычесть из общей продолжительности процесса $T_{75\%}$ лаг-фазу λ , то можно определить

эффективную продолжительность метаногенного разложения органического отхода ($T_{эфф.}$), т.к. продолжительность лаг-фазы в основном обусловлена буферной ёмкостью среды и адаптацией инокулята к условиям эксперимента в периодическом режиме. В то же время при непрерывной подаче субстрата малыми порциями за счёт адаптированности микробного сообщества реактора к сбраживаемому субстрату лаг-фаза практически отсутствует.

На первом этапе эксперимента самым высоким потенциальным выходом метана (γ) характеризовались ОСВ-ПВ и КРС-НС. Максимальная скорость выхода метана (K) была самой высокой для ОСВ-К и КРС-СС, однако параметр γ был чуть ниже, чем у ОСВ-ПВ и КРС-НС. Продолжительность лаг-фазы (λ) была самой короткой для ОСВ-НС, ОСВ-СС и КРС-ПВ (Таблица 11). На втором этапе эксперимента, при повышении нагрузки по органическому веществу, самый высокий γ также был у флаконов ОСВ-ПВ и КРС-НС. Параметр максимальная скорость выхода метана (K) был самым высоким для флаконов КРС-НС и ОСВ-К, продолжительность лаг-фазы (λ) была самой короткой для флаконов ОСВ-ПВ, ОСВ-К, КРС-НС и КРС-К (Таблица 12). На третьем этапе эксперимента, при внесении ЛЖК в концентрации 12,5 г/л, самый высокий потенциальный выход метана был у флаконов ОСВ-НС, ОСВ-КВ, КРС-ПВ и КРС-НС. Параметр K был самым высоким у ОСВ-НС, ОСВ-КВ и КРС-ПВ. Лаг-фаза была самой короткой для контрольных флаконов ОСВ-К и КРС-К (Таблица 13).

Для оценки вклада DIET в процесс анаэробного сбраживания обычно оценивают эти три параметра: γ , K и λ (Yin et al., 2018). Полученные нами данные могут предположительно подтвердить протекание DIET для второго этапа эксперимента в КРС-НС, и вероятно в ОСВ-ПВ, а для третьего в ОСВ-НС, ОСВ-КВ и КРС-ПВ.

Таблица 11. Кинетические параметры процесса анаэробного сбраживания на первом этапе эксперимента по сбраживанию комплексного отхода свинофермы.

Параметр	Единица измерения	ОСВ-К	ОСВ-КВ	ОСВ-ПВ	ОСВ-НС	ОСВ-СС	КРС-К	КРС-КВ	КРС-ПВ	КРС-НС	КРС-СС
Модифицированное уравнение Гомперца											
γ	мл $\text{CH}_4/\text{г ОВ}$	245,6	307,8	309,9	251,2	258,2	255,1	222,6	278,2	322,5	300,6
K	мл $\text{CH}_4/(\text{г ОВ}/\text{сутки})$	53,7	32,8	33,0	25,5	26,4	27,9	19,1	21,1	25,5	44,6
λ	сутки	6,6	4,8	4,5	4,2	4,2	5,0	4,9	4,6	5,3	6,8
$T_{75\%}$	сутки	10,4	12,6	12,3	12,4	12,3	12,6	14,5	15,5	15,8	12,4
$T_{\text{эфф}}$	сутки	3,8	7,8	7,8	8,1	8,1	7,5	9,6	10,9	10,5	5,6
R^2	-	0,99	0,99	0,99	1,00	0,99	0,98	0,99	0,99	0,99	0,99
Модель первого порядка											
k	сутки ⁻¹	0,098	0,080	0,084	0,084	0,084	0,080	0,066	0,062	0,058	0,078
R^2	-	0,86	0,89	0,89	0,91	0,91	0,88	0,89	0,91	0,89	0,85

Таблица 12. Кинетические параметры процесса анаэробного сбраживания на втором этапе эксперимента по сбраживанию комплексного отхода свинофермы.

Параметр	Единица измерения	ОСВ-К	ОСВ-КВ	ОСВ-ПВ	ОСВ-НС	ОСВ-СС	КРС-К	КРС-КВ	КРС-ПВ	КРС-НС	КРС-СС
Модифицированное уравнение Гомперца											
γ	мл $\text{CH}_4/\text{г ОВ}$	210,0	211,3	256,5	203,6	202,4	212,0	182,5	167,6	249,3	212,4
K	мл $\text{CH}_4/(\text{г ОВ}/\text{сутки})$	24,2	18,3	21,3	23,5	23,4	23,6	17,3	27,4	28,4	17,6
λ	сутки	0,5	0,0	0,0	0,8	0,3	0,1	0,7	0,4	0,1	0,0
$T_{75\%}$	сутки	7,7	9,5	10,0	8,0	7,5	7,6	9,4	5,4	7,4	9,7
$T_{\text{эфф}}$	сутки	7,2	9,4	9,9	7,2	7,2	7,4	8,7	5,1	7,3	9,7
R^2	-	0,98	0,99	0,96	0,98	0,99	0,98	0,98	0,99	0,99	0,99
Модель первого порядка											
k	сутки ⁻¹	0,165	0,140	0,133	0,156	0,173	0,173	0,136	0,231	0,176	0,138
R^2	-	0,98	0,99	0,97	0,98	0,99	0,99	0,98	0,99	0,99	0,99

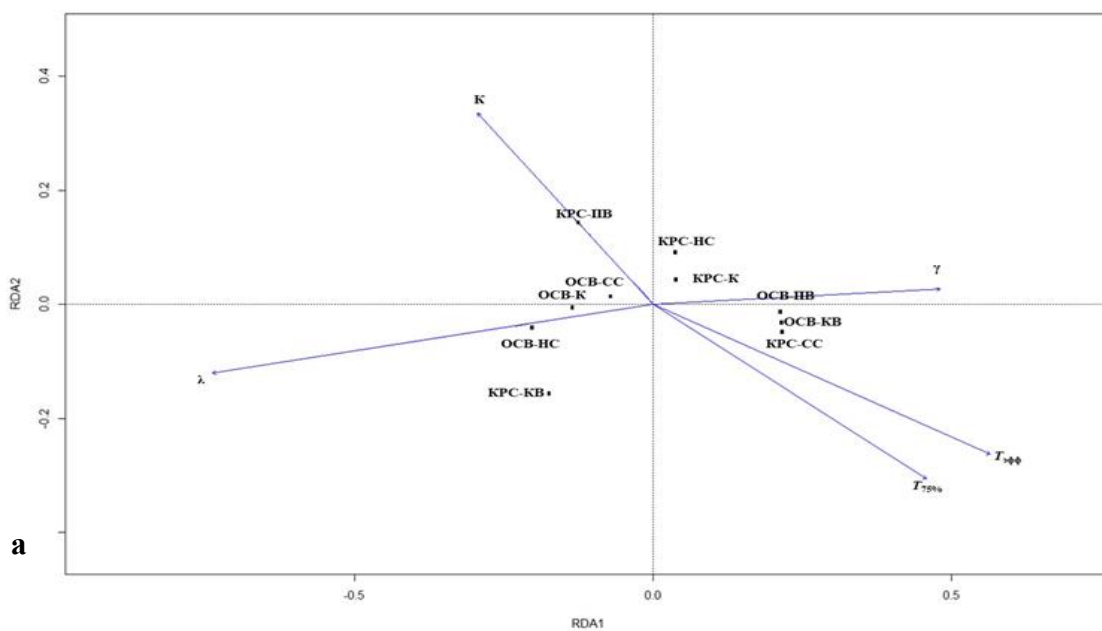
Таблица 13. Кинетические параметры процесса анаэробного сбраживания на третьем этапе эксперимента по сбраживанию смеси летучих жирных кислот в высокой концентрации.

Параметр	Единица измерения	ОСВ-К	ОСВ-КВ	ОСВ-ПВ	ОСВ-НС	ОСВ-СС	КРС-К	КРС-КВ	КРС-ПВ	КРС-НС	КРС-СС
Модифицированное уравнение Гомперца											
γ	мл $\text{CH}_4/\text{г}$ ХПК	310,1	389,9	305,5	416,8	289,1	589,2	590,7	898,3	882,6	794,9
K	мл $\text{CH}_4/(\text{г}$ ХПК/ сутки)	13,5	44,1	24,9	55,3	14,1	28,6	44,6	49,2	33,1	43,4
λ	сутки	0,44	3,74	6,29	4,72	2,21	6,94	8,66	14,97	9,36	9,07
$T_{90\%}$	сутки	27,9	14,3	21,0	13,7	26,8	31,6	24,5	36,8	41,2	32,6
$T_{\text{эфф}}$	сутки	27,4	10,6	14,7	9,0	24,5	24,7	15,8	21,8	31,8	23,5
R^2	-	0,99	1,00	1,00	0,99	0,99	1,00	1,00	1,00	0,99	0,99
Модель первого порядка											
k	сутки ⁻¹	0,043	0,077	0,032	0,079	0,033	0,0027	0,0079	0,0001	0,0004	0,0001
R^2	-	0,99	0,94	0,93	0,91	0,98	0,96	0,92	0,90	0,96	0,94

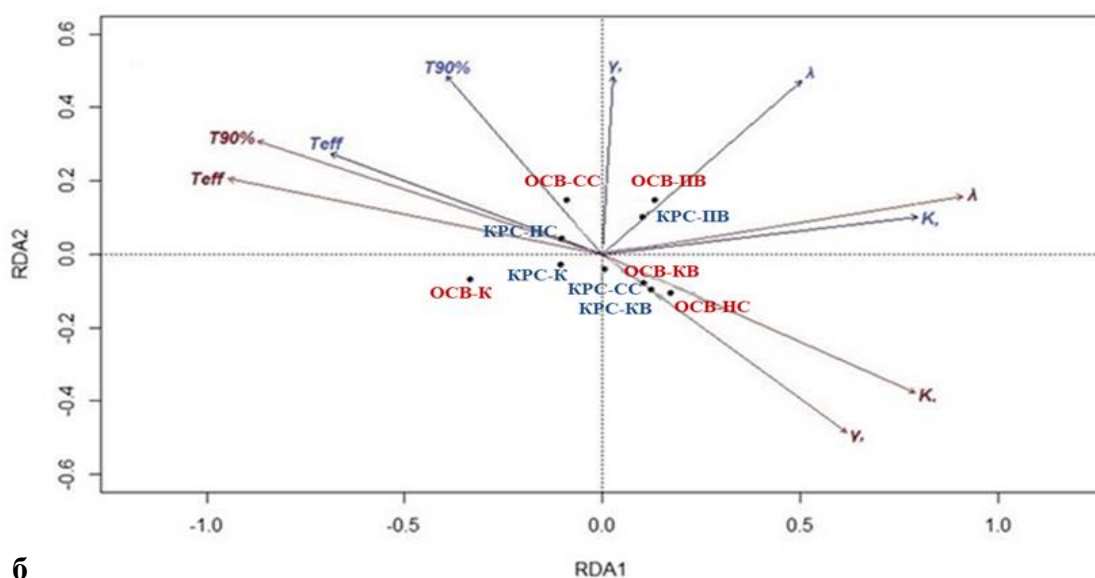
Анализ избыточности (RDA) был использован для количественной оценки относительного вклада комбинаций материала/инокулята в кинетические параметры АС на втором и третьем этапах эксперимента. Тест Мантеля показал значительную положительную корреляцию между комбинациями материал/инокулят и кинетическими параметрами. Наиболее значимыми для анализа параметрами были λ ($R = 0,7481$; $p = 0,00001$), $T_{эфф}$ ($R = 0,569$; $p = 0,0022$), $T_{75\%}$ ($R = 0,3756$; $p = 0,0186$) и K ($R = 0,3385$; $p = 0,0283$) между всеми факторами, рассматриваемыми в этом исследовании, которые также включали параметры γ и K (Рисунок 8). На втором этапе эксперимента наблюдалась положительная корреляция флаконов ОСВ-ПВ с γ и отрицательная с λ , а у КРС-НС наблюдалась положительная корреляция с K и отрицательная с λ (Рисунок 8 а). На третьем этапе эксперимента наблюдалась положительная корреляция ОСВ-КВ и ОСВ-НС с K и γ , а у КРС-ПВ с λ (Рисунок 8 б).

Ранее было показано, что при высоких начальных содержаниях ОВ в периодических реакторах внесение электропроводящих материалов может улучшать характеристики анаэробного сбраживания. Так, при содержании 8% ОВ в смесях инокулята с субстратом в виде свиного навоза, добавление Fe_2O_3 приводило к увеличению максимальной скорости образования метана на 31,9% и потенциального выхода метана на 11,04% (Lu et al., 2019). При аналогичном содержании ОВ и свином навозе в качестве субстрата добавление магнетита увеличивало продукцию метана на 16,1% (Zhang et al., 2019). При содержании ОВ 10% в смеси инокулята с субстратом в виде просеянного свиного навоза добавление нулевалентного железа увеличивало продукцию метана на 22% (Meng et al., 2020). При АС пропионата и бутирата в литературе описано положительное влияние графитового войлока и увеличение средней скорости образования метана на 19,1% и 16,7%, а применение щеток на основе карбонового и стального волокна при АС синтетического субстрата с глюкозой в качестве источника углерода положительно влияло на процесс, в отличие от щеток на основе полиэфира (Zhang et al., 2019; Baek et al., 2021).

Механизм увеличения выхода метана за счет стимуляции DIET с ЭМ в высоконагруженных системах АС объясняется переходом от опосредованного переноса электронов через водород и формиат (ПЕТ) к прямому межвидовому переносу электронов (DIET). В случае DIET с ЭМ сброс электронов осуществляется на электропроводящий материал. В высоконагруженной системе баланс потребления водорода при ПЕТ может быть ниже скорости образования H_2 , и процесс АС начнет ингибироваться; активизация процесса DIET позволяет этого избежать (Baek et al., 2018).



a



б

Рисунок 8. Анализ избыточности (RDA), показывающий взаимосвязь между комбинациями инокулят/материал и кинетическими параметрами АС на втором (а) и третьем (б) этапах эксперимента. OCB-K, OCB-KB, OCB-ПВ, OCB-НС, OCB-СС, KPC-K, KPC-KB, KPC-ПВ, KPC-НС, KPC-СС обозначали основные компоненты комбинаций инокулята/материала и K , λ , $T_{75\%}$, $T_{90\%}$, $T_{эфф}$, γ указывают основные кинетические параметры АС, рассматриваемые в данном исследовании.

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что внесение материалов для биообрастания и образование на них биопленок (рассмотрено ниже в разделе 4.2) может влиять на увеличение выхода метана и при относительно невысоких нагрузках (начальных

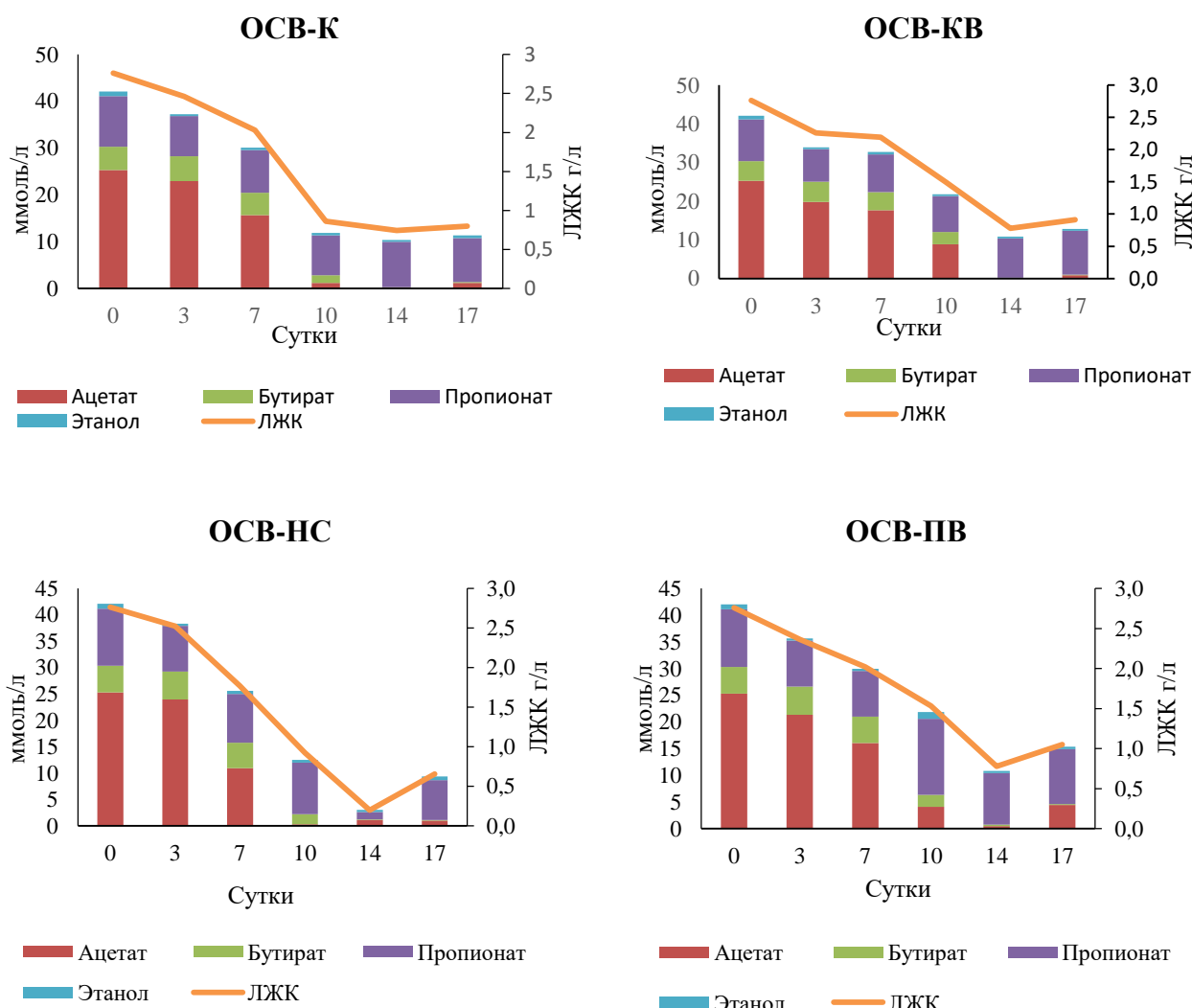
концентрациях ОВ), и при высокой концентрации ЛЖК на систему АС. Однако наличие и интенсивность этого влияния зависит от микробного сообщества (инокулята) и от природы материала. Таким образом, согласно полученным результатам можно отметить (1) важность биопленкообразования на подходящем материале (рассмотрено ниже в разделе 4.2) и специфичность инокулята, (2) признаки активизации процесса DIET с ЭМ при повышении нагрузки по органическому веществу, в частности на втором (КРС/сток свинокомплекса) и третьем (ОСВ/смесь ЛЖК) этапах эксперимента во флаконах с нержавеющей сталью и карбоновым войлоком, (3) возможную активизацию DIET с участием е-пилей или цитохромов с-типа при использовании ОСВ в качестве инокулята на втором и КРС на третьем этапе эксперимента, за счет плотного контакта клеток и образования пилей в биопленках с полиэфирным войлоком или стекловолокном.

4.1.2. Динамика образования и потребления ЛЖК, удаление органического вещества

Помимо динамики и кинетических параметров метаногенеза, влияние электропроводящих и инертных материалов на процесс АС комплексного отхода свинофермы (смесь сточных вод и навоза) и смеси ЛЖК в высокой концентрации с применением двух видов инокулятов (КРС и ОСВ) оценивалось по степени разложения ЛЖК, ХПК (ХПК_{раств.} и ХПК_{ЛЖК}) и общего органического вещества (ОВ).

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 происходило 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 наблюдалось заметное снижение его концентрации (Рисунок 9). 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. Однако при этом стоит учитывать разные начальные концентрации ЛЖК (Рисунок 10) и степень разложения ОВ (Таблица 13). В начале третьего этапа эксперимента концентрации ацетата, пропионата и бутирата были равны 121 мМ, 49 мМ и 20,5 мМ во всех флаконах. К 12 дню эксперимента концентрации ацетата, пропионата и бутирата снизились до 39 мМ, 33 мМ и 12 мМ для ОСВ-КВ, а для ОСВ-НС составили 53 мМ, 32 мМ и 15 мМ; концентрация ЛЖК в ОСВ-К была выше и составила 60 мМ, 49 мМ и 19 мМ. 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 (Рисунок 11). 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. Однако в ходе эксперимента флаконы КРС-ПВ более эффективно разлагали бутират, на восьмые сутки разница с КРС-К и другими флаконами составляла более 7 мМ (Рисунок 11). Данные по разложению ЛЖК соответствуют динамике изменения рН во флаконах (Рисунок 12). Интересно отметить, что во флаконах с КРС в качестве инокулята происходило более полное разложение ЛЖК, в сравнении с ОСВ, это может быть связано с множеством факторов, в том числе с составом микробного сообщества.



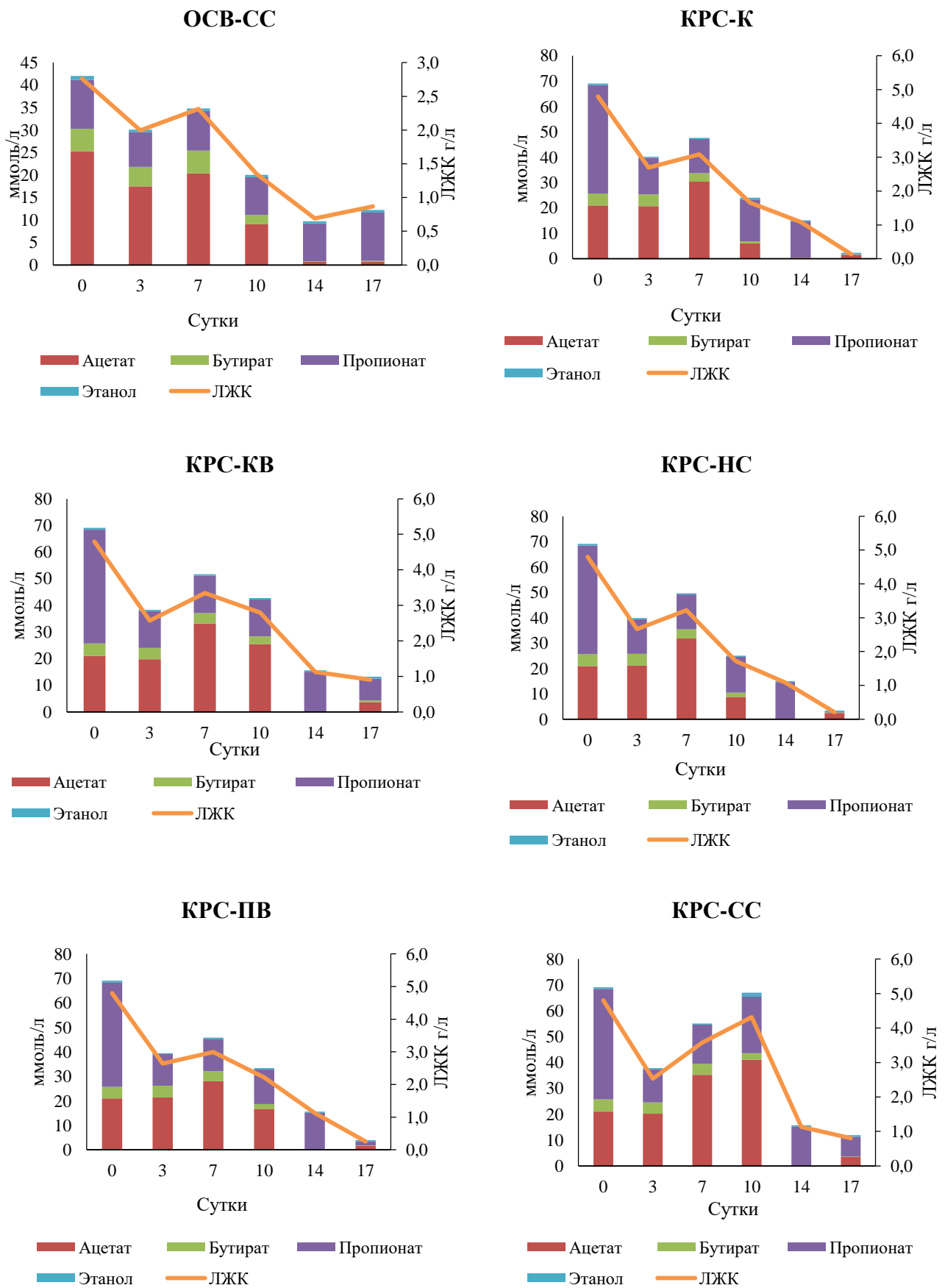
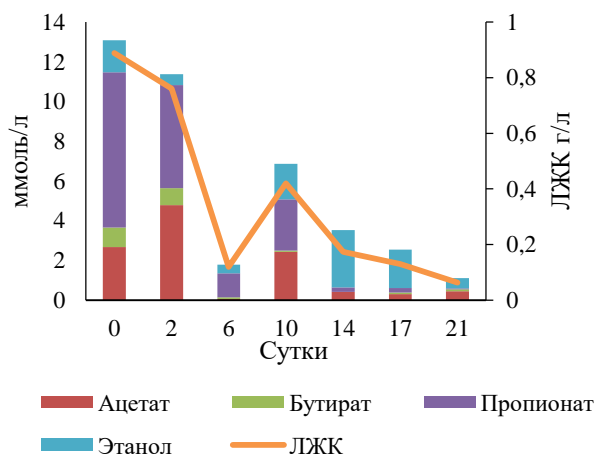
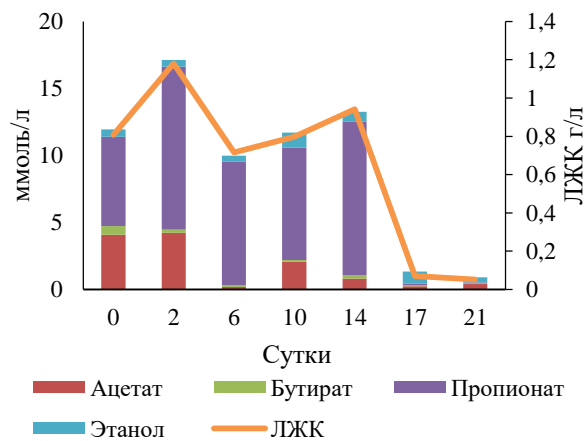
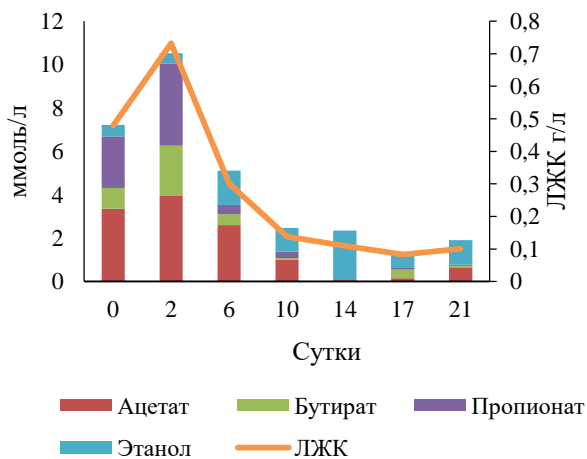
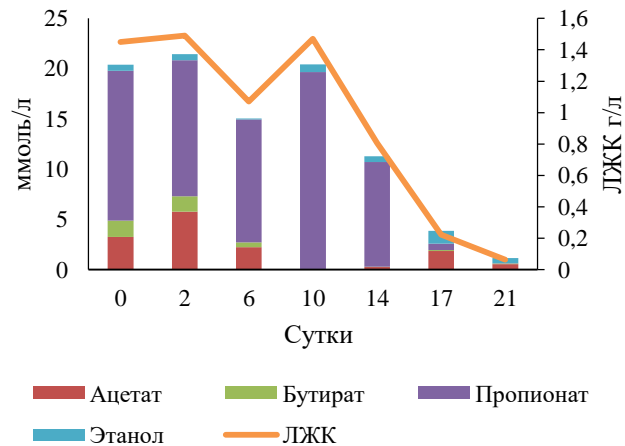
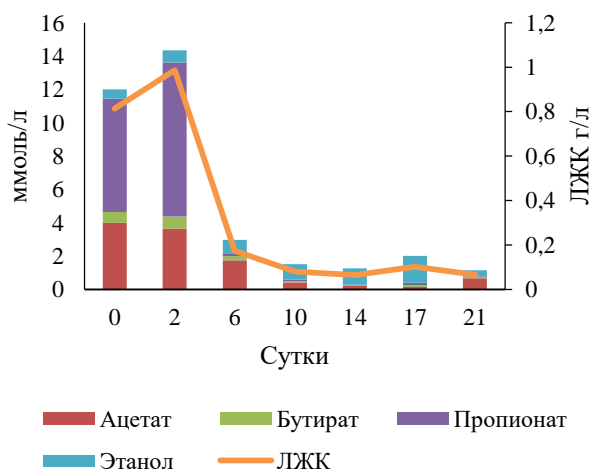
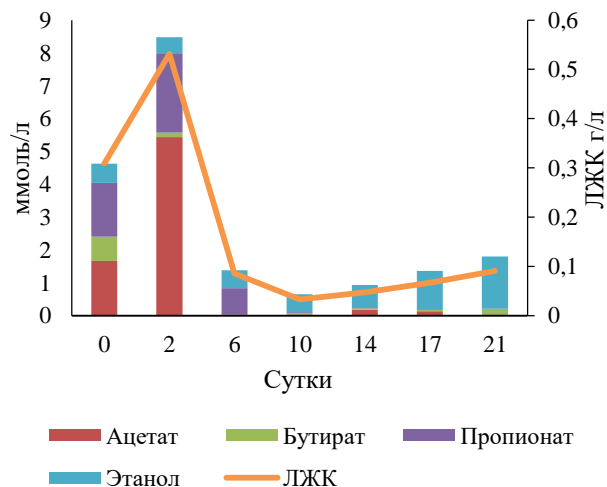


Рисунок 9. Динамика концентрации ЛЖК при анаэробном сбраживании свиного навоза на первом этапе эксперимента.

ОСВ-К**ОСВ-КВ****ОСВ-НС****ОСВ-ПВ****ОСВ-СС****КРС-К**

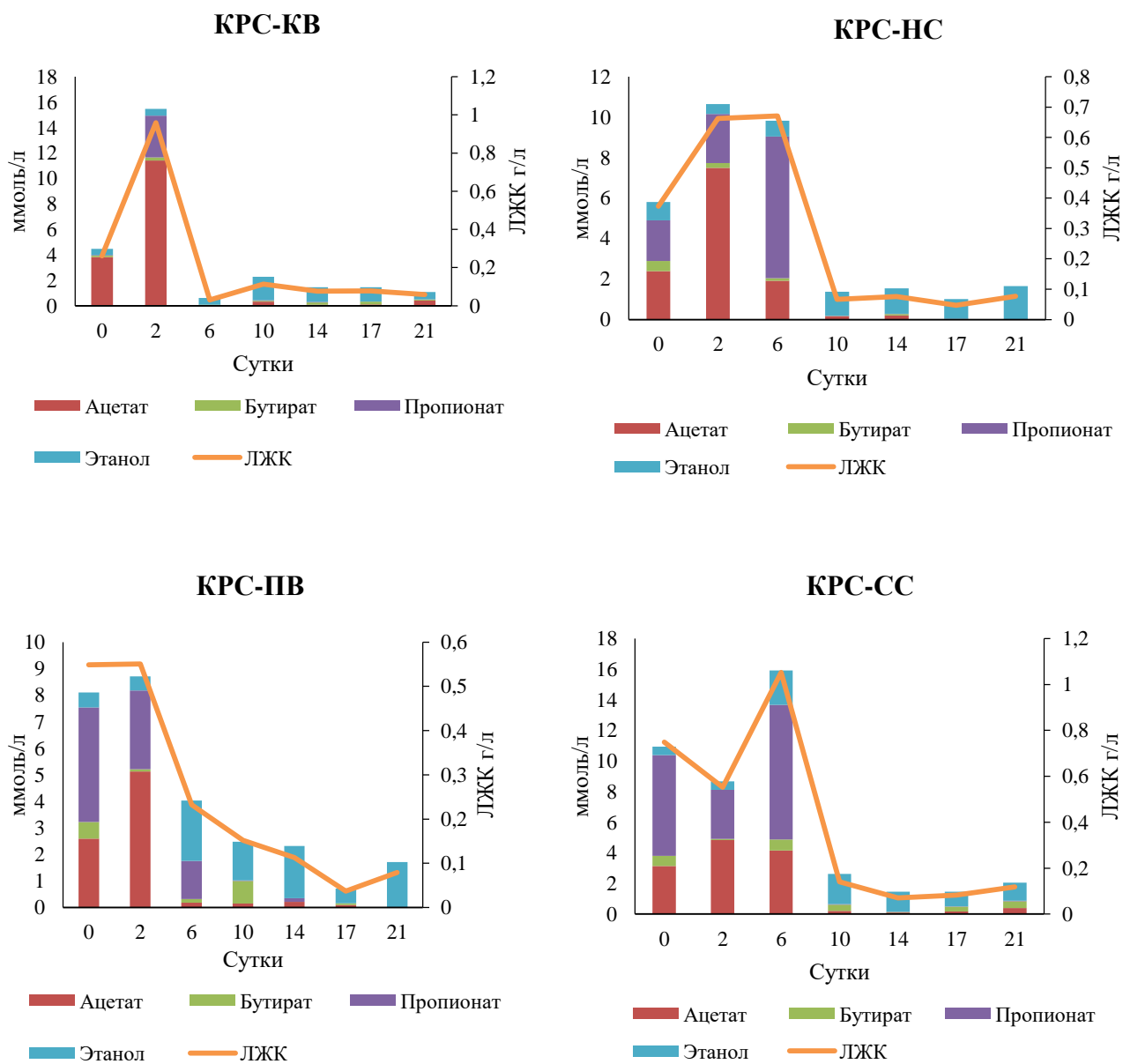
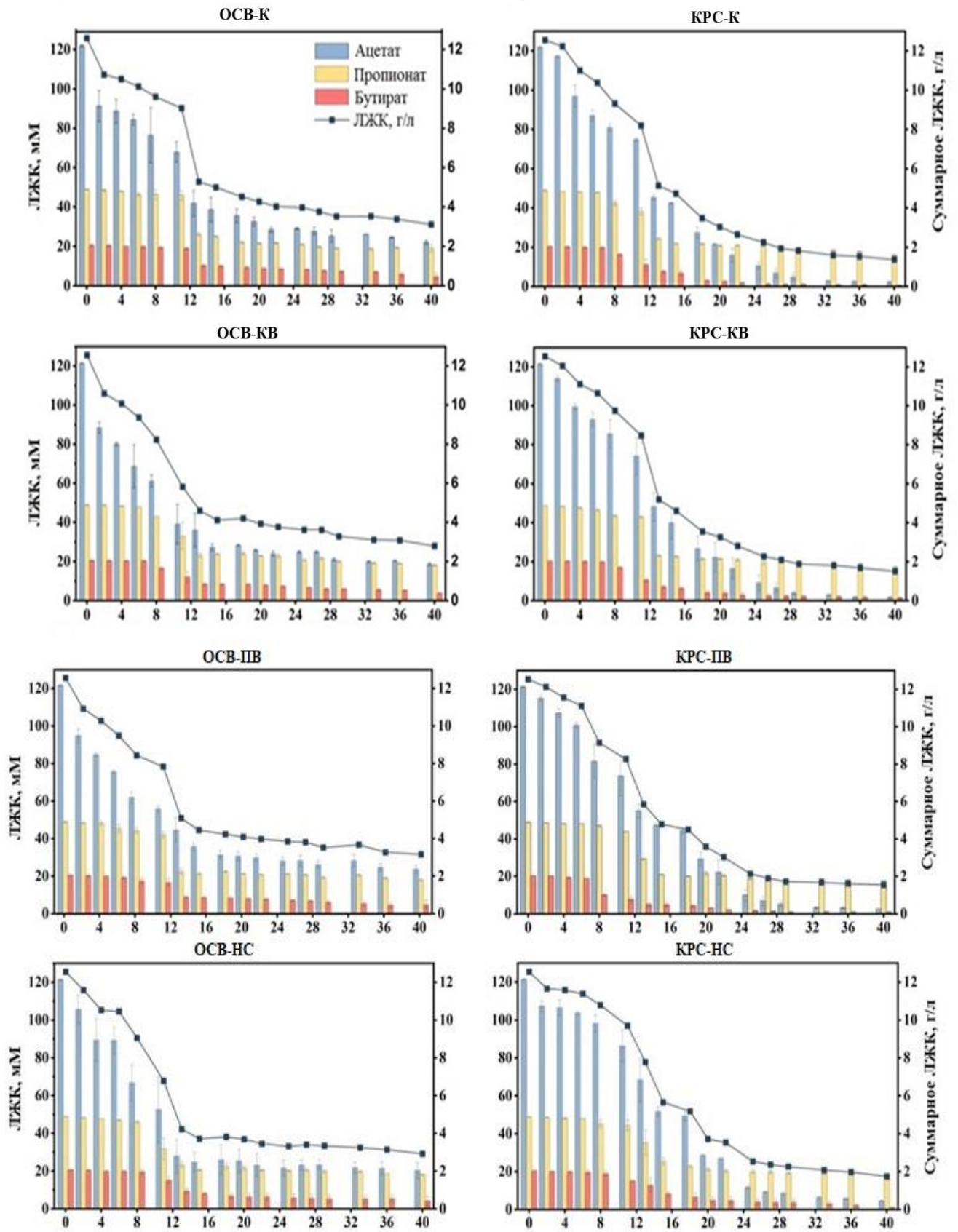


Рисунок 10. Динамика концентрации ЛЖК при анаэробном сбраживании свиного навоза на втором этапе эксперимента.



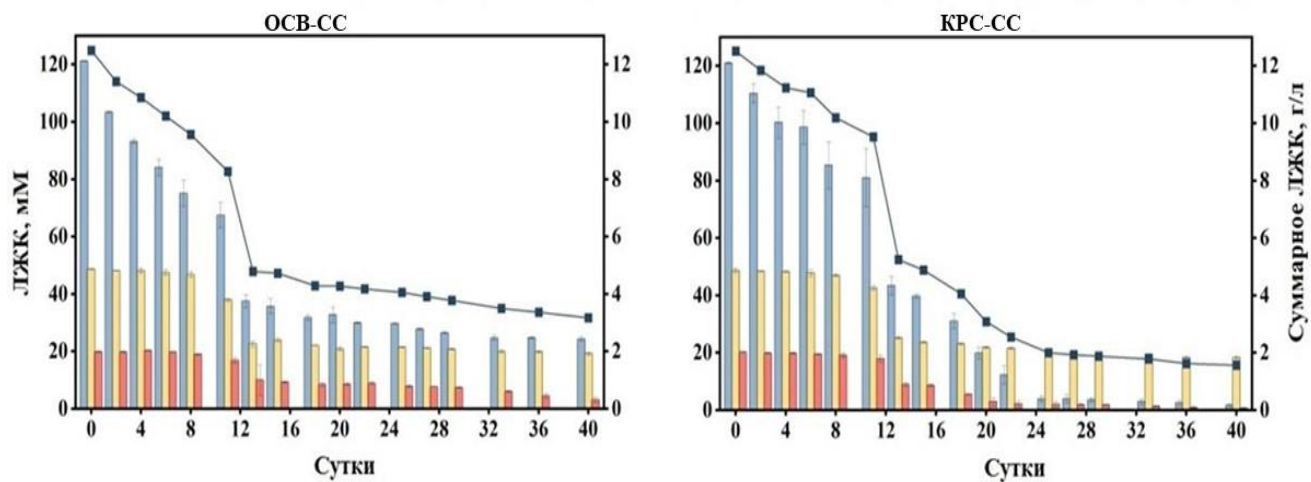
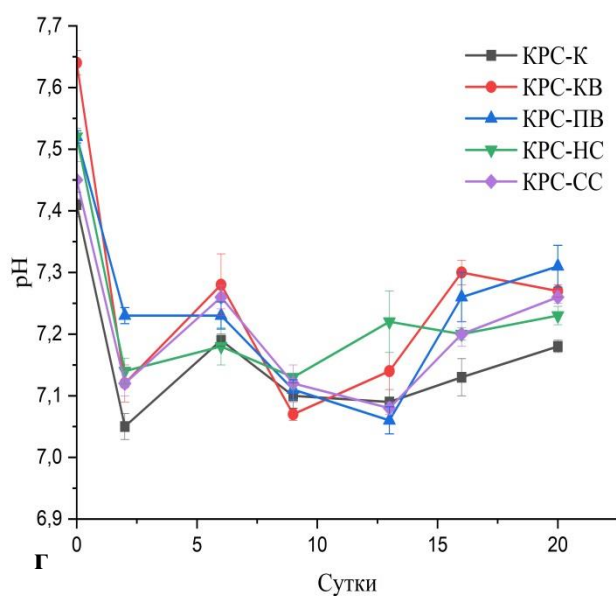
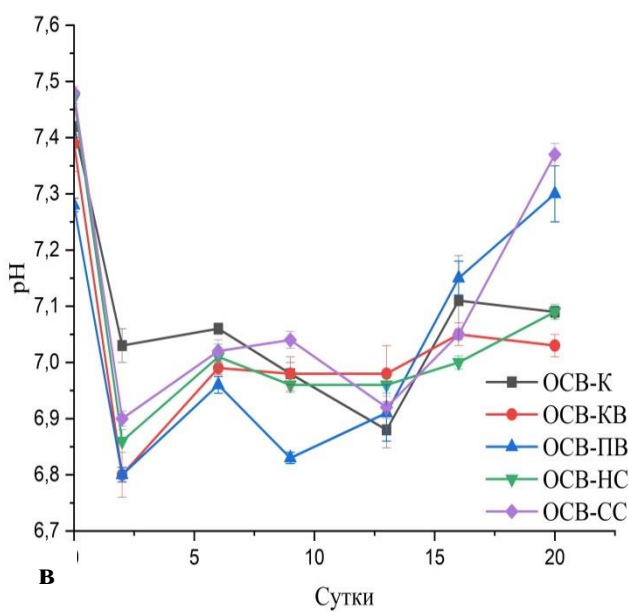
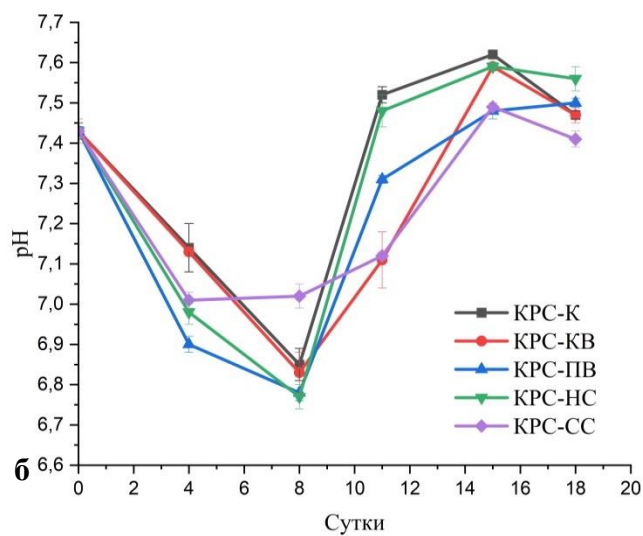
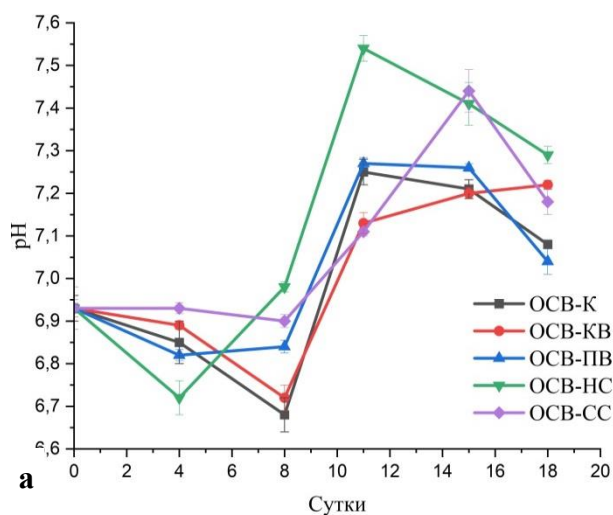


Рисунок 11. Динамика концентрации ЛЖК при анаэробном сбраживании смеси ЛЖК в высокой концентрации на третьем этапе эксперимента.



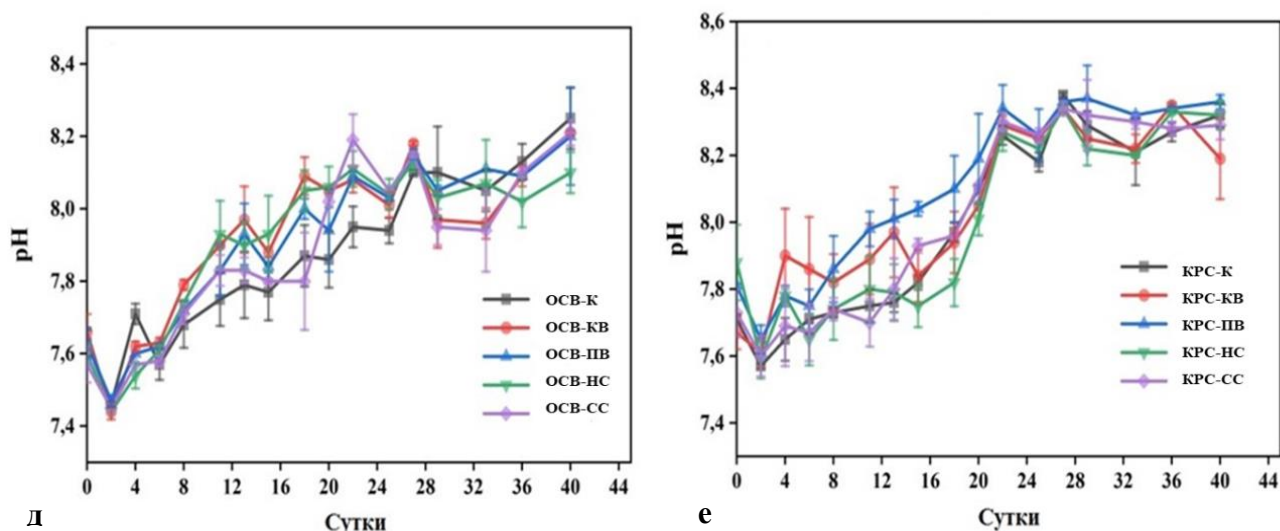


Рисунок 12. Динамика значений pH при анаэробном сбраживании свиного навоза во флаконах, инокулированных ОСВ (а, в, д) и КРС (б, г, е) на первом (а, б), втором (в, г) и третьем (д, е) этапах эксперимента.

Из данных, представленных в таблице 13, видно, что на первом этапе эксперимента более высокая степень разложения ХПК_{раств.} наблюдалась в ОСВ-ПВ, КРС-ПВ, КРС-НС; ОСВ – в ОСВ-К, ОСВ-НС, ОСВ-СС, КРС-КВ и КРС-НС. На втором этапе степень разложения ХПК_{раств.} была выше в ОСВ-НС, КРС-К, КРС-НС и КРС-СС; ОСВ лучше разлагался в ОСВ-НС и КРС-НС. На третьем этапе эксперимента степень удаления ХПК_{лжк} к 12 суткам эксперимента составила 51% для ОСВ-КВ и ОСВ-НС, а для ОСВ-К – 25% по сравнению с началом эксперимента (Рисунок 13 а). Степень удаления ХПК_{лжк} 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_{лжк} к концу эксперимента (40 сутки) составила 88% для КРС-ПВ и 86% для КРС-К и оставшихся флаконов (Рисунок 13 б).

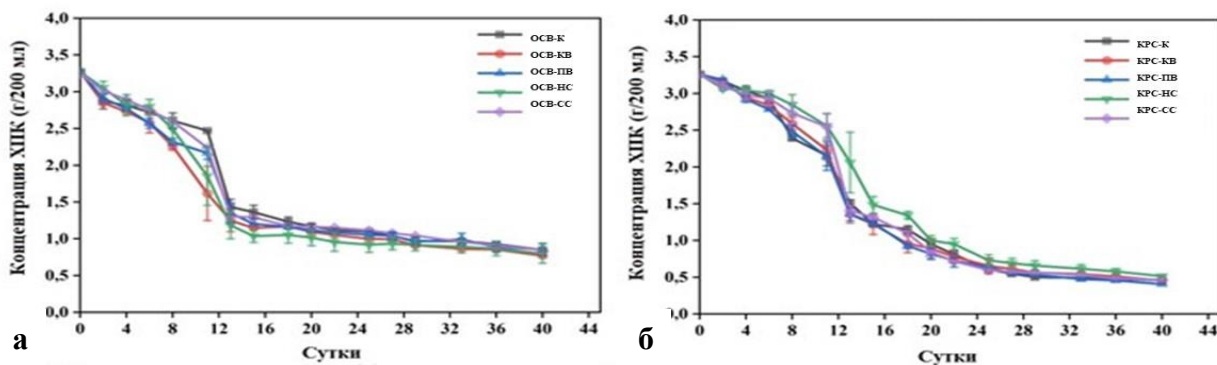


Рисунок 13. Динамика удаления ХПК для третьего этапа эксперимента по АС смеси ЛЖК в высокой концентрации с ОСВ(а) и КРС (б) в качестве инокулята.

Таблица 13. Сравнительная характеристика степени разложения растворенного и нерастворенного органического вещества для первого и второго этапа экспериментов.

Флакон	Степень удаления в конце первого этапа эксперимента, %		Степень удаления в конце второго этапа эксперимента, %	
	ХПК раств.	ОВ	ХПК раств.	ОВ
ОСВ-К	18	31	37	21
ОСВ-КВ	17	23	38	22
ОСВ-ПВ	32	23	43	26
ОСВ-НС	27	30	42	36
ОСВ-СС	16	31	37	26
КРС-К	34	29	45	35
КРС-КВ	31	31	42	21
КРС-ПВ	37	25	43	29
КРС-НС	37	30	43	40
КРС-СС	27	25	44	39

В целом, использование нержавеющей сетки и КРС в качестве инокулята способствовало лучшему разложению органического вещества, как на первом, так и на втором этапе эксперимента, а на третьем этапе наиболее эффективно процесс разложения ЛЖК шел в ОСВ-КВ, ОСВ-НС и КРС-ПВ. Различия в степени разложения общего и растворенного ОВ, а также скорости разложения ЛЖК могут быть связаны с активным биоупленкообразованием на поверхности внесенных материалов (рассмотрено ниже в разделе 4.2) и появившимися в связи с этим преимуществами, например, защитой от неблагоприятных условий и более эффективной коммуникации различных групп микроорганизмов внутри биопленки.

4.2. Особенности морфологии биопленок на поверхности материалов

В процессе АС на поверхности материалов формировались биообрастания, которые исследовались с помощью сканирующей электронной и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии.

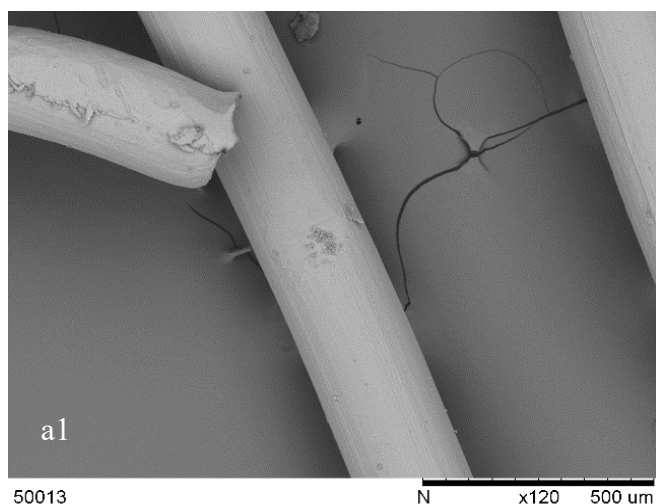
4.2.1. Результаты сканирующей электронной микроскопии

Метод сканирующей микроскопии использовали для визуализации биопленок, образующихся на различных материалах. При использовании ОСВ в качестве инокулята биообрастание на поверхности нержавеющей стали и стекловолокна происходило достаточно интенсивно. К концу первого этапа эксперимента (18-ые сутки инкубации) биопленками визуально была покрыта третья часть поверхности материалов, а на втором и третьем этапах эксперимента – практически вся. Однако при пробоподготовке к проведению сканирующей микроскопии большая часть биопленки отделялась от материала и оставалась в растворе. Поэтому на фотографиях (Рисунок 14) видны только их прикрепленные остатки. Биопленки, образовавшиеся на нержавеющей стали и сетке из стекловолокна, были представлены в основном клетками размером 1–3 мкм с разной морфологией. Однако структуры биопленок в ОСВ-НС и ОСВ-СС значительно отличались. Биопленки в ОСВ-НС были представлены большим процентом мелких и крупных округлых клеток, а также более плотным полисахаридным матриксом (Рисунок 14 а). Биопленка в ОСВ-СС имела более рыхлую текстуру и была пронизана большим числом пилеподобных структур, связывающих клетки между собой (Рисунок 14 б).

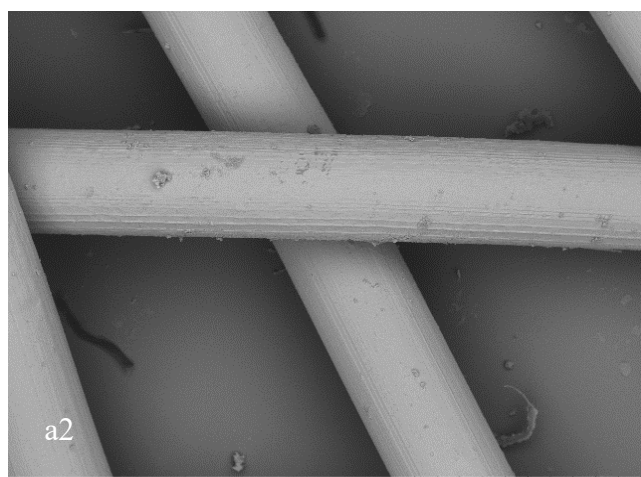
Биообрастание двух типов войлоков с применением ОСВ в качестве инокулята отличалось между собой. Для карбонового войлока было свойственно образование очень плотного матрикса, заполняющего всё пространство в гуще волокон (Рисунок 14 в). Матрикс на полиэфирном войлоке имел более рыхлую структуру, располагаясь по всей поверхности волокон (Рисунок 14 г). На фотографиях, сделанных при большем увеличении видно, что, как и в случае с сетками, биопленка на инертном полиэфирном войлоке состоит из очень мелких палочкообразных клеток и пронизана большим числом пилеподобных структур. Этого не наблюдали в случае электропроводящего карбонового войлока, где матрикс имел очень плотную структуру, с большим содержанием полисахаридов, которые после обработки этиловым спиртом в ходе пробоподготовки к микроскопированию превращались в монолитные структуры (запекшиеся лепестки). При этом мелкие клетки становятся менее заметны, а внимание привлекают достаточно крупные (более 3 мкм) округлые клетки или споры, содержание которых на карбоновом войлоке выше, чем на полиэфирном войлоке.

Для карбонового войлока 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 (Рисунок 14 д). Структура обрастания была аналогична обрастаниям с использованием ОСВ в качестве инокулята. Однако внутренняя структура биопленок, образующихся при использовании КРС в качестве инокулята, была несколько другой. Они были очень похожи

друг на друга, плотные, слипшиеся. Вероятно, существенный вклад вносит пробоподготовка, из-за которой происходит «слипание» матрикса и его уплотнение, клетки были палочковидными, некрупными. Биопленка на нержавеющей стали с КРС в качестве инокулята в отличие от ОСВ-НС была меньшей плотности и богата палочковидными и кокковидными клетками. Биопленки КРС-СС в отличие от ОСВ-СС характеризовались меньшей адгезией и большей степенью разрушения материала носителя и высокой степенью морфологического разнообразия клеток (Рисунок 14 з). Интересно отметить, что во всех флаконах на всех материалах носителях при использовании ОСВ и КРС в качестве инокулятов были обнаружены пилеподобные структуры.



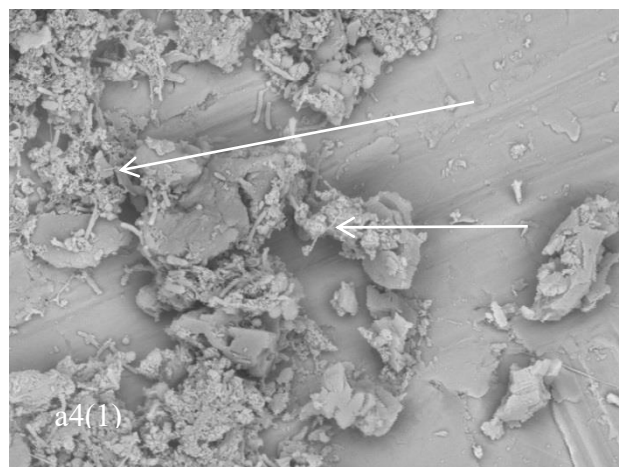
50013 N x120 500 um



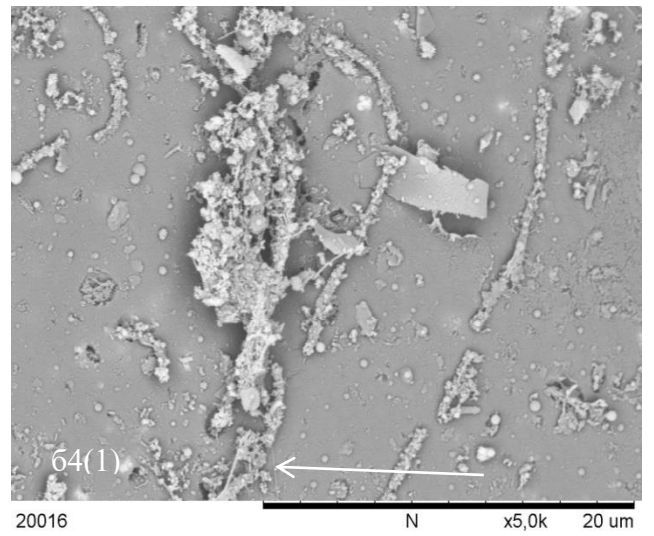
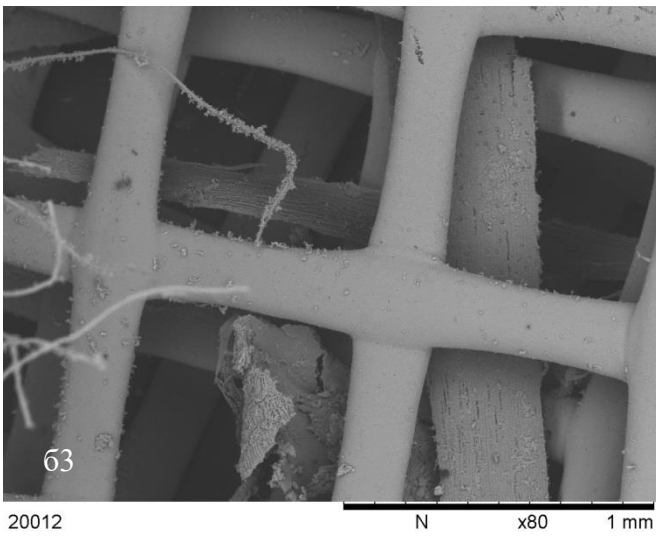
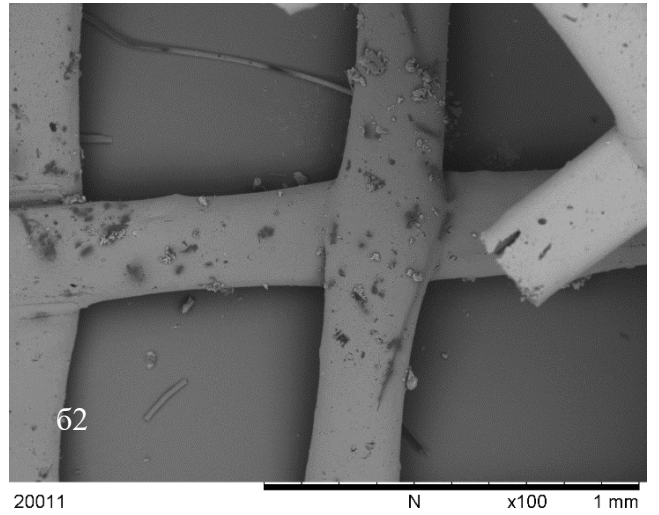
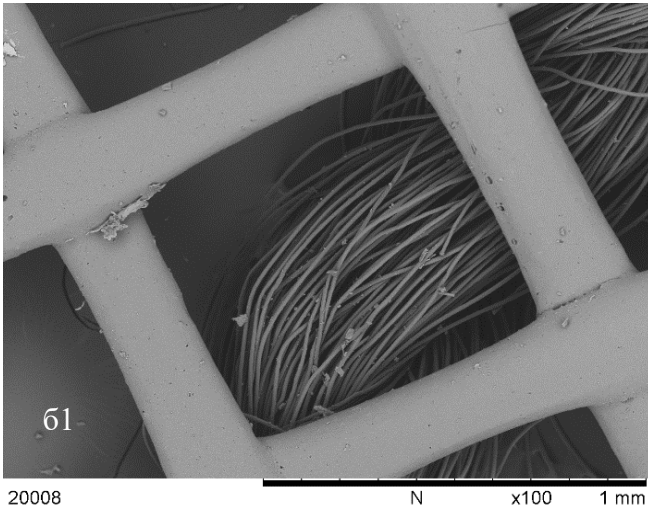
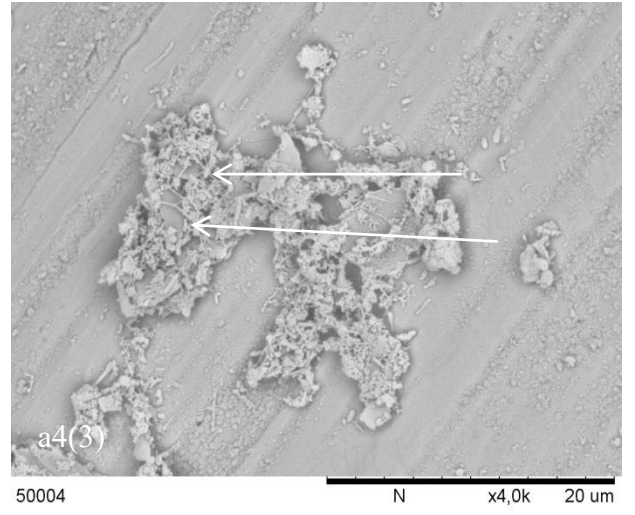
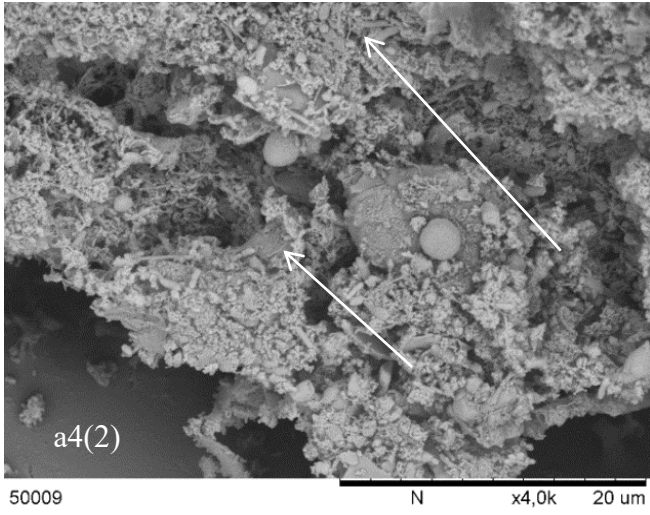
50004 N x120 500 um

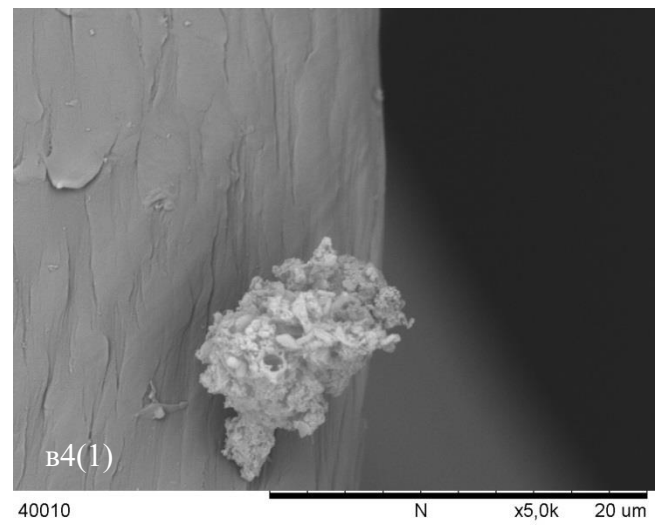
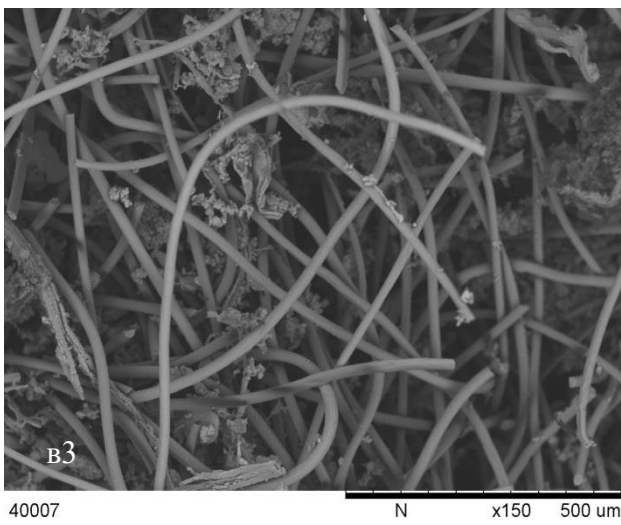
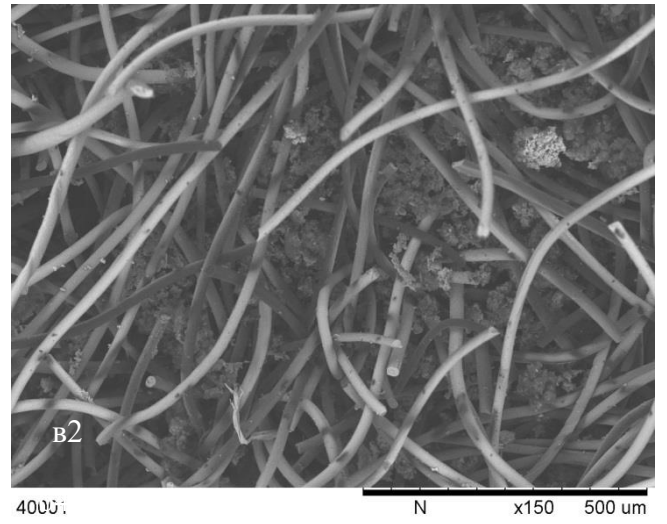
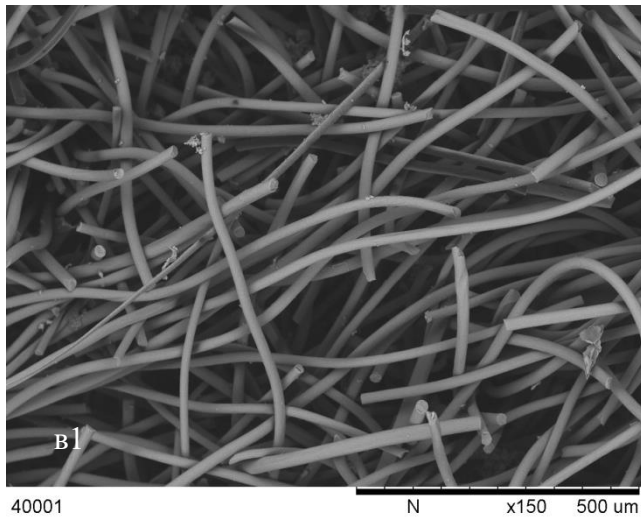
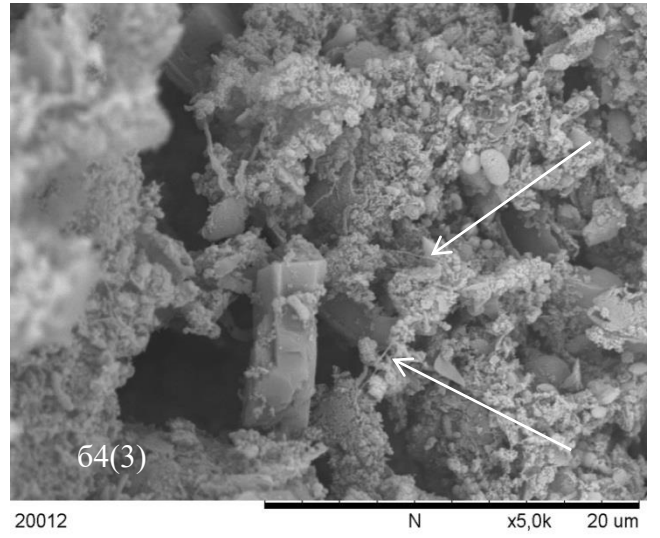
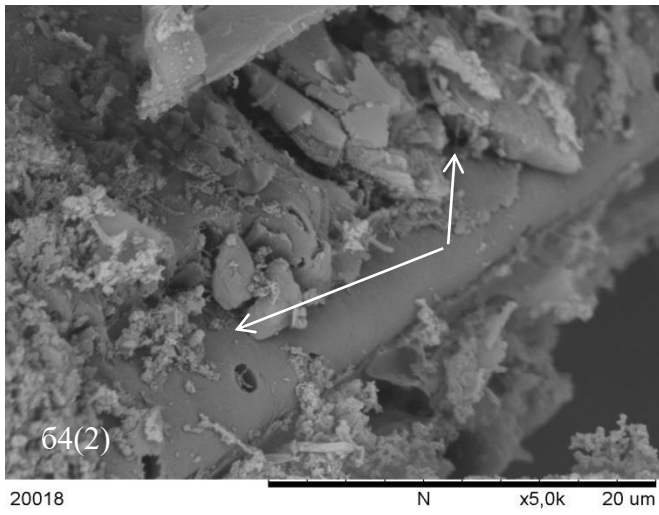


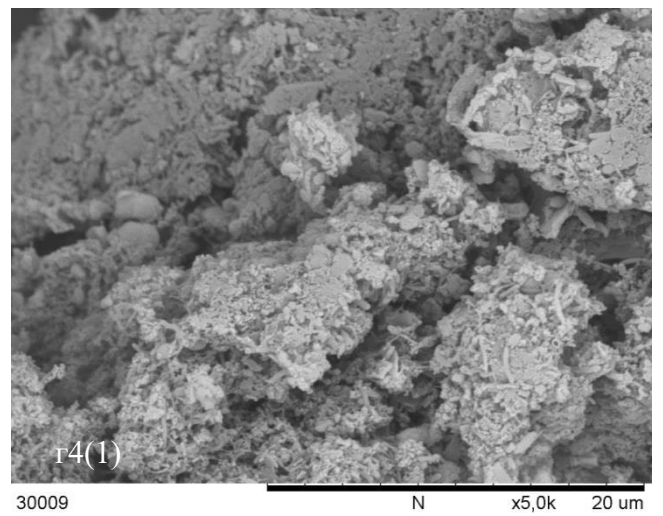
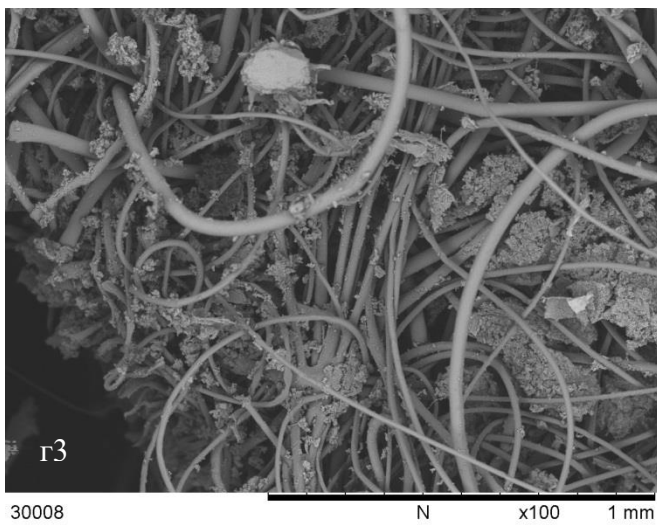
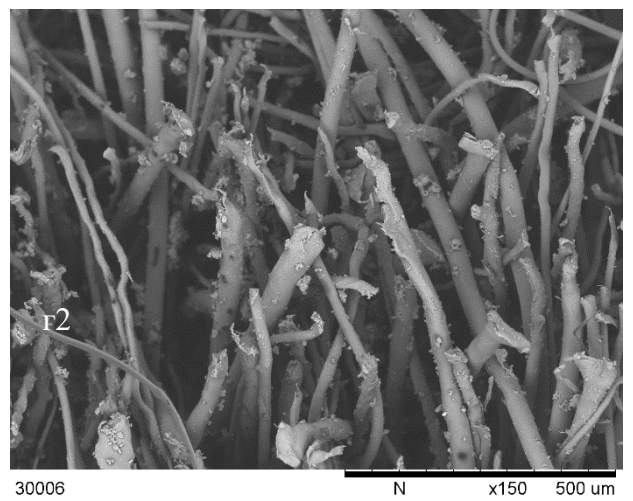
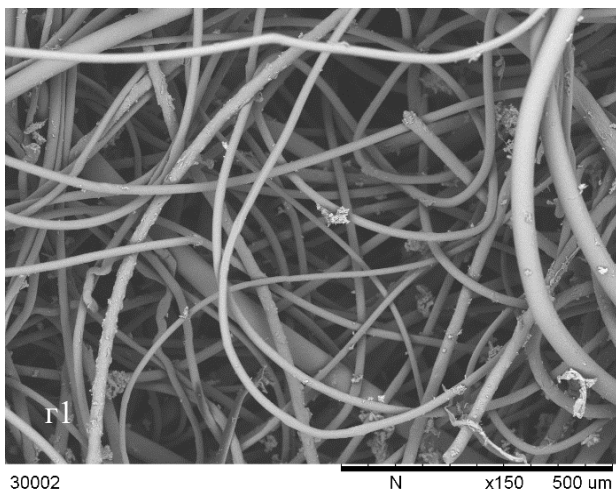
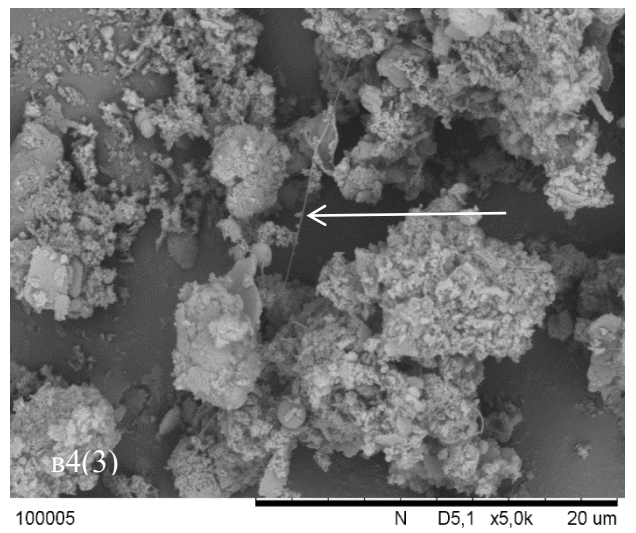
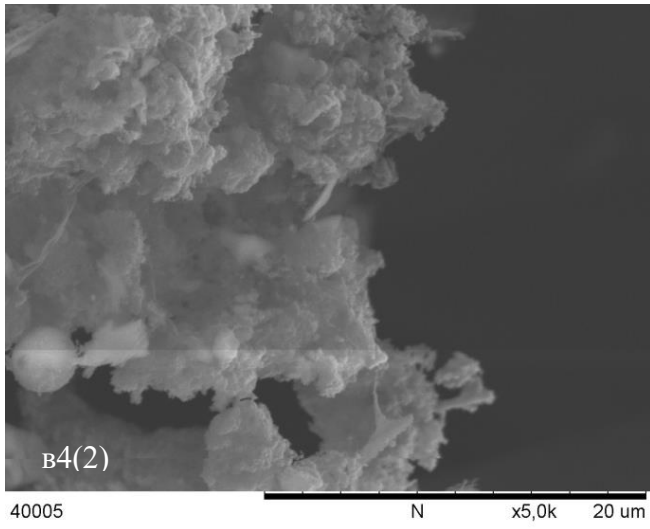
50002 N x150 500 um

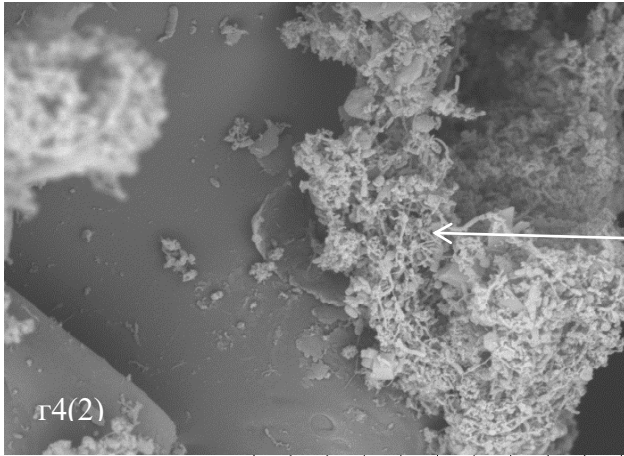


50010 N x4,0k 20 um

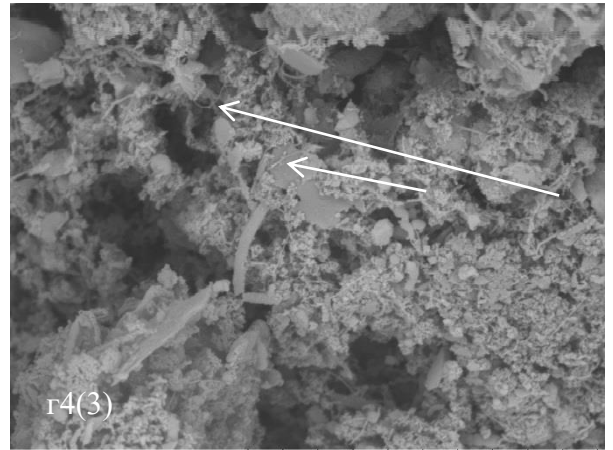




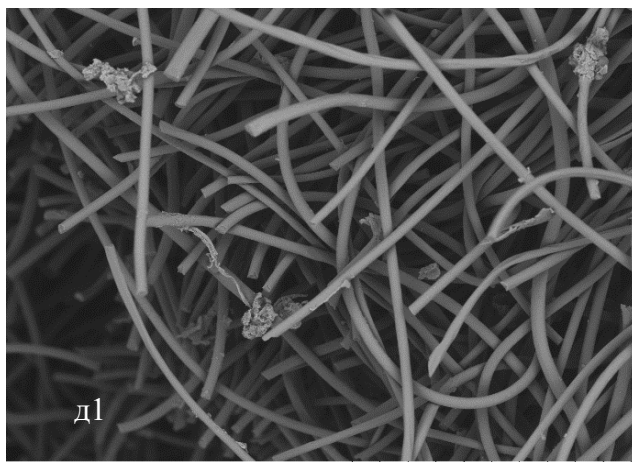




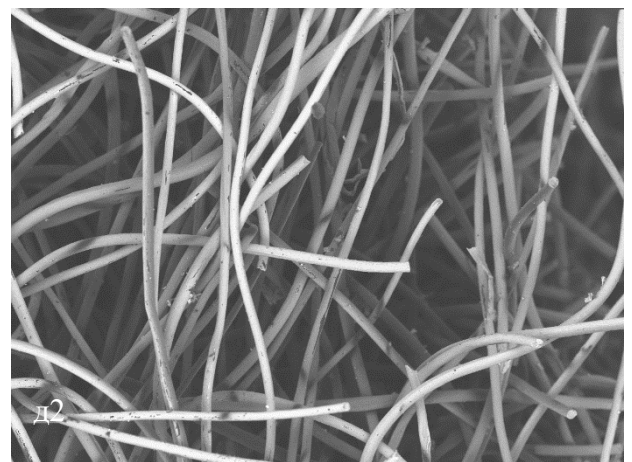
30013 N x5,0k 20 μm



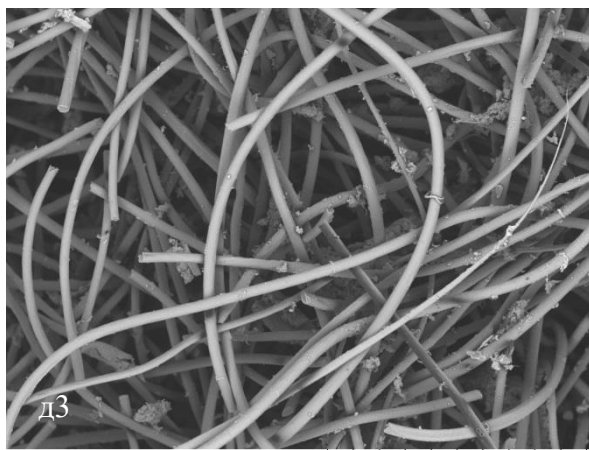
30009 N x5,0k 20 μm



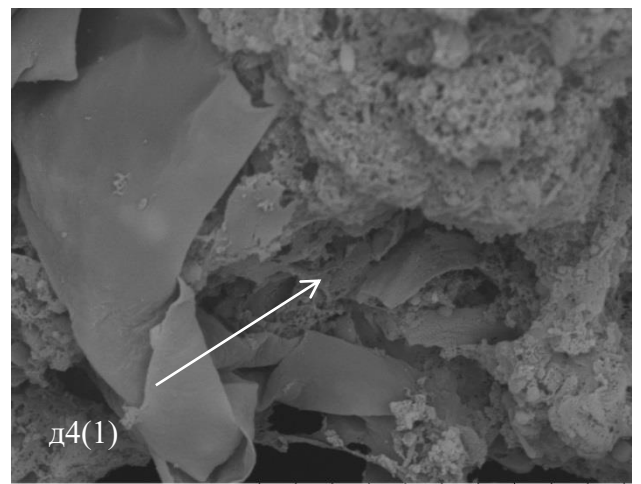
10012 N x150 500 μm



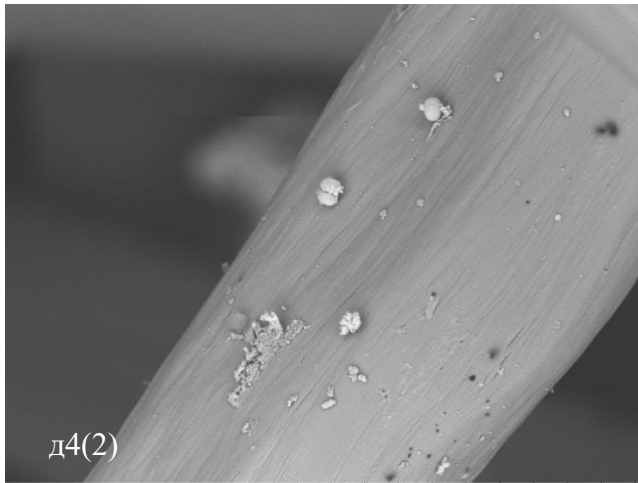
10006 N x150 500 μm



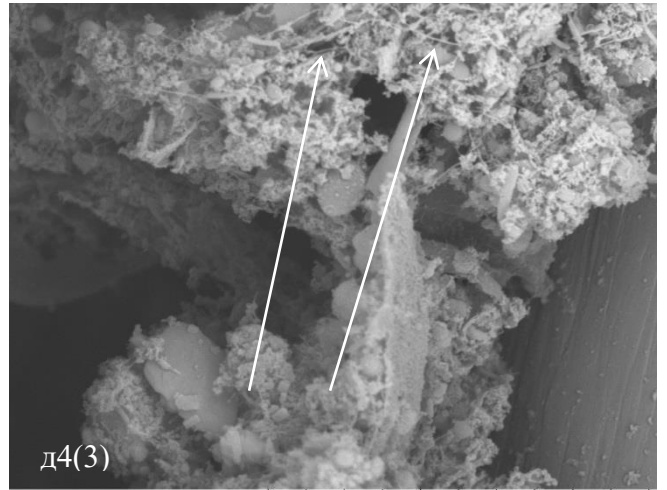
10001 N x150 500 μm



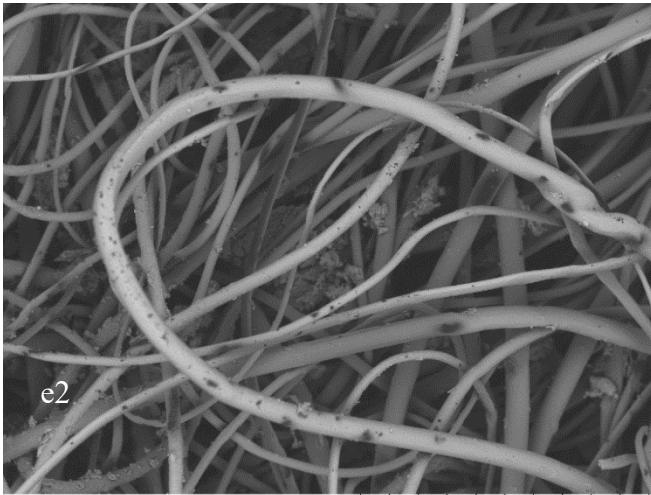
10013 N x5,0k 20 μm



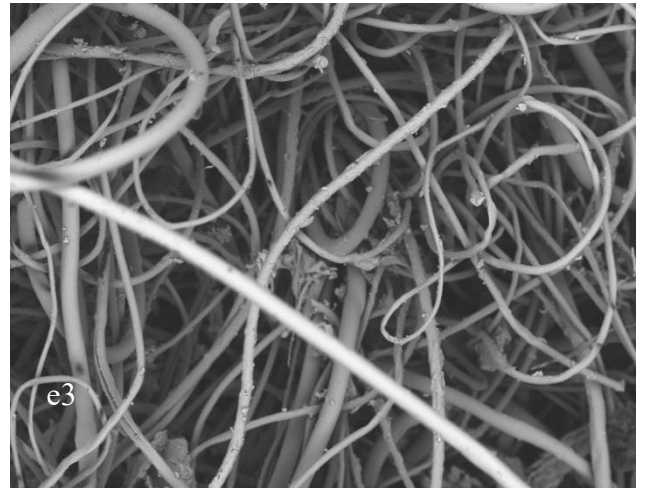
10009 N x3,0k 30 um



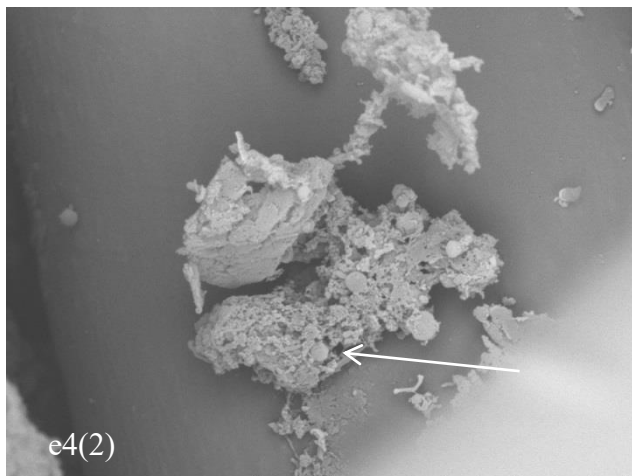
10007 N x5,0k 20 um



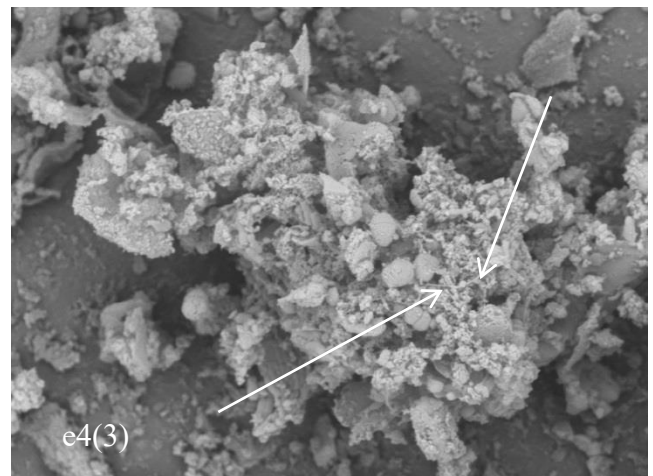
60009 N x150 500 um



60002 N x120 500 um



60016 N x5,0k 20 um



60010 N D5,1 x5,0k 20 um

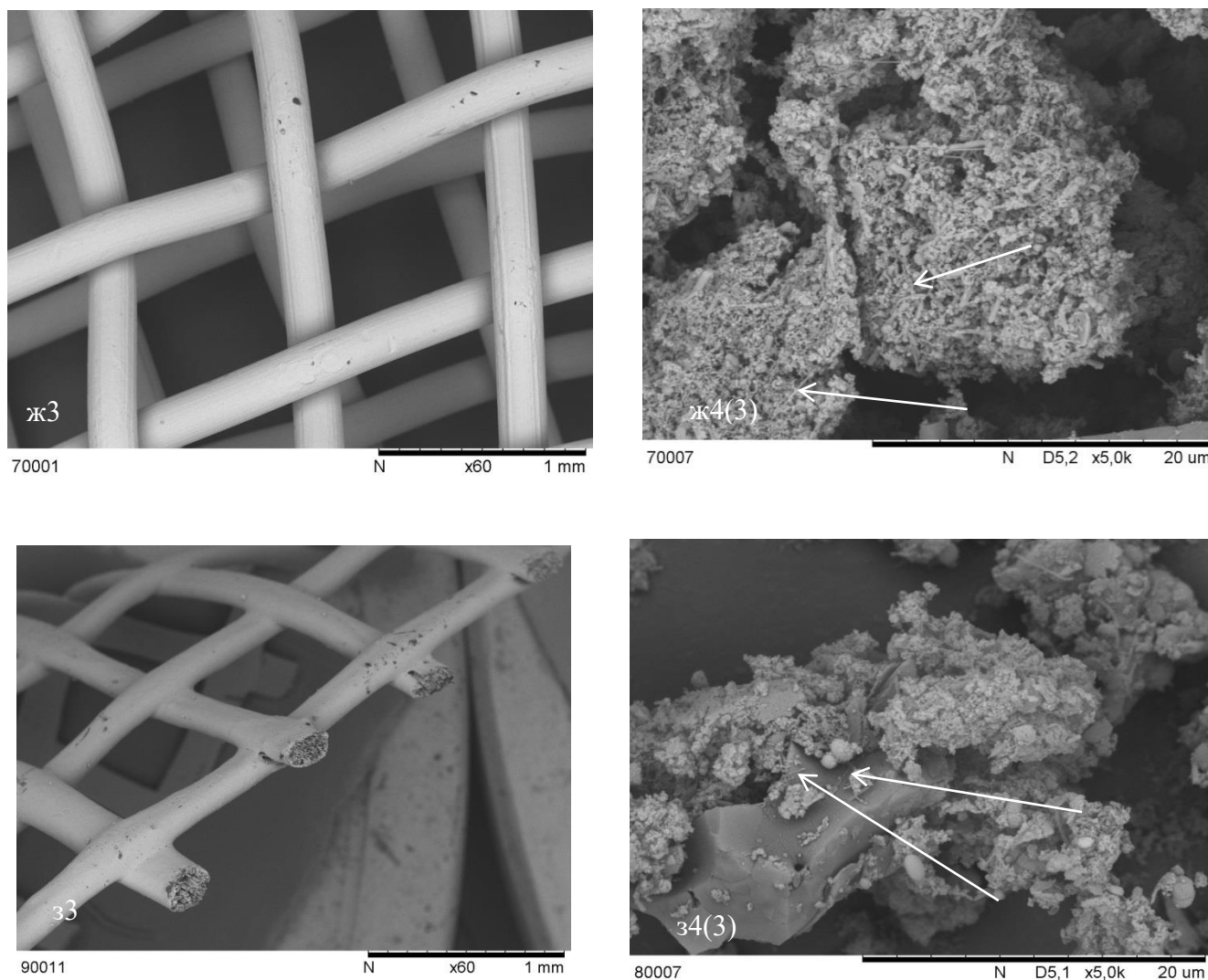


Рисунок 14. СЭМ-изображения, показывающие образование локальных биопленок на поверхности сетки из нержавеющей стали (ОСВ-НС) (а), сетки из стекловолокна (ОСВ-СС) (б), карбонового войлока (ОСВ-КВ) (в), полиэфирного войлока (ОСВ-ПВ) (г), с инокулятом ОСВ, и карбонового войлока (КРС-КВ) (д), полиэфирного войлока (КРС-ПВ) (е), сетки из нержавеющей стали (КРС-НС) (ж), сетки из стекловолокна (КРС-СС) (з) с инокулятом КРС. Цифры 1, 2 и 3 обозначают этапы эксперимента; цифрой 4 обозначена структура биопленки, в скобках указан этап эксперимента, снятая с более высоким разрешением, стрелками отмечены пилеподобные структуры.

4.2.2. Результаты конфокальной лазерной сканирующей микроскопии

Известно, что в течение первого месяца роста микробные клетки прикрепляются к материалу и формируют небольшие колонии, окруженные экзополисахаридным матриксом, на волокнах и в пространстве между ними (Niederdorfer et al., 2021). Полученные микрофотографии на первом этапе эксперимента отражали наличие на поверхности материалов как сообществ микроорганизмов в виде биопленок, так и отдельных прикрепленных клеток

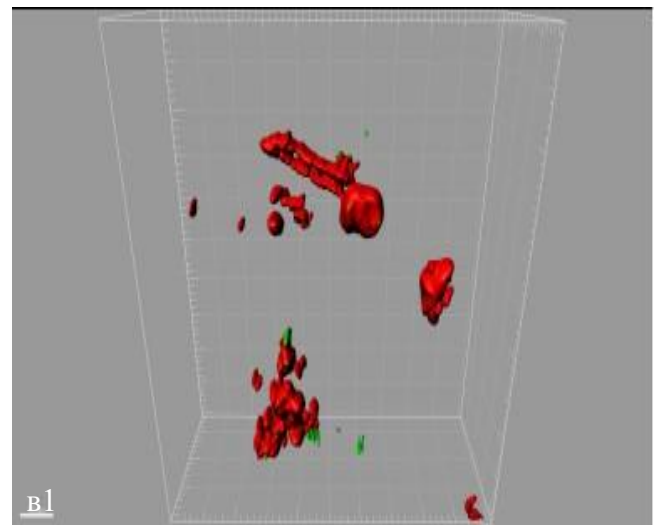
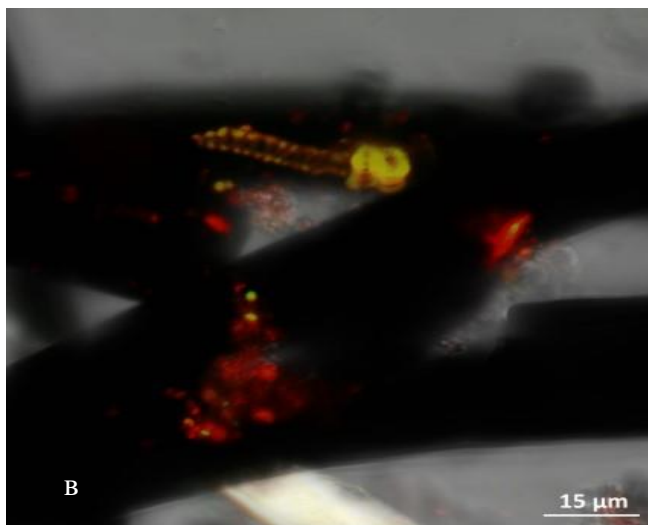
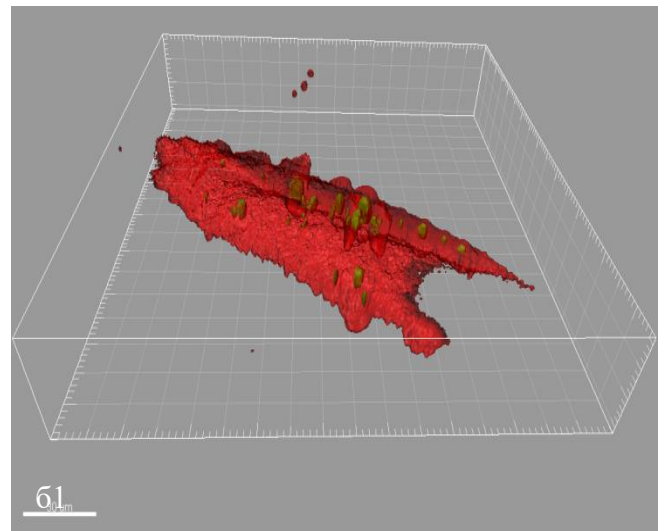
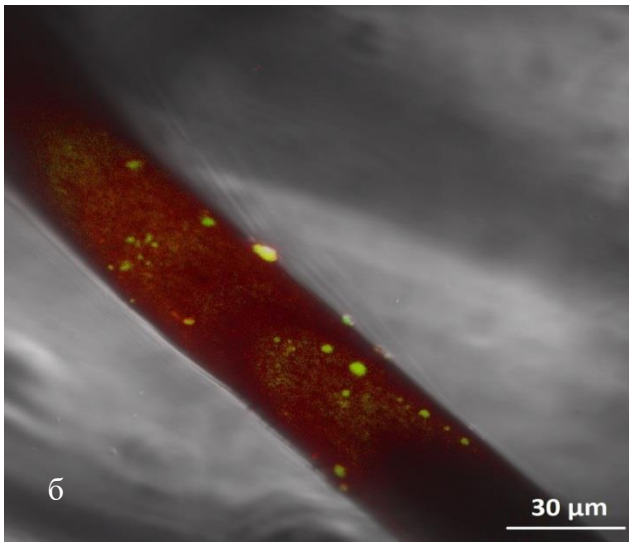
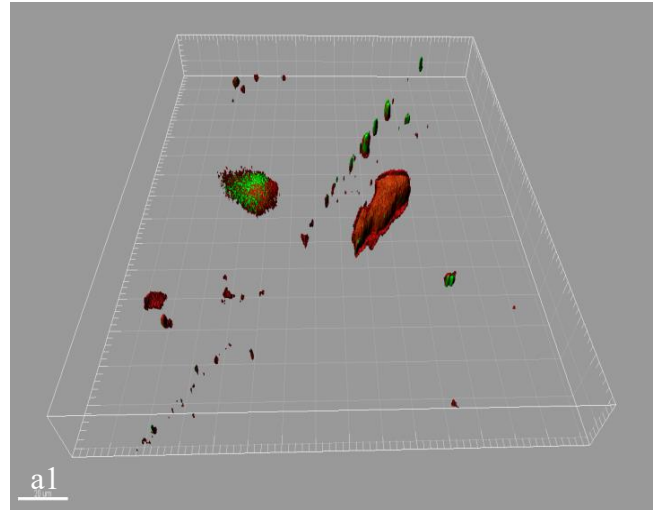
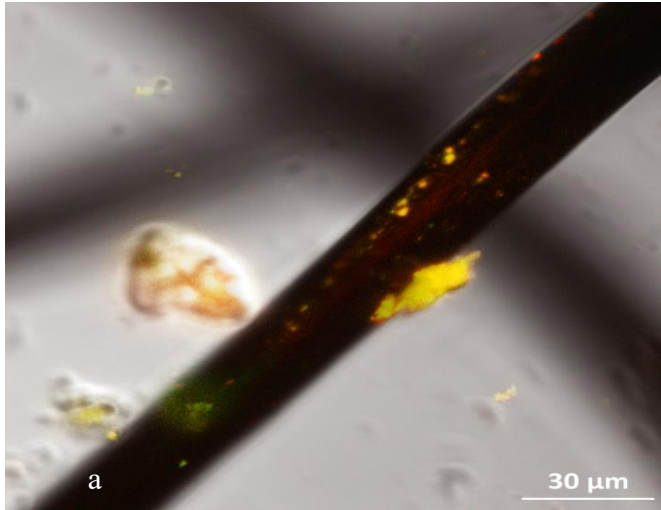
(Рисунок 15). Отмечалось, что обрастание КРС-КВ шло преимущественно единичными или сгруппированными в небольшие колонии клетками, формирование биопленок шло в межслое материала или вдоль волокна (Рисунок 15 а). Данные подтверждаются соотношением объёма биопленки к поверхности, который отражает степень адгезии биопленки к материалу (Таблица 14). Обрастание полиэфирного войлока шло вдоль волокна, клетки были рассеяны в матриксе биопленки, покрытие экзополисахаридами (ЭПС) достигало 75,4%. Расчёты показали, что биопленка развивалась эффективнее на поверхности КРС-ПВ. Коэффициент шероховатости отражает неоднородность биопленки на полиэфирном войлоке и наличие микроколоний, окружённых общим ЭПС-матриксом.

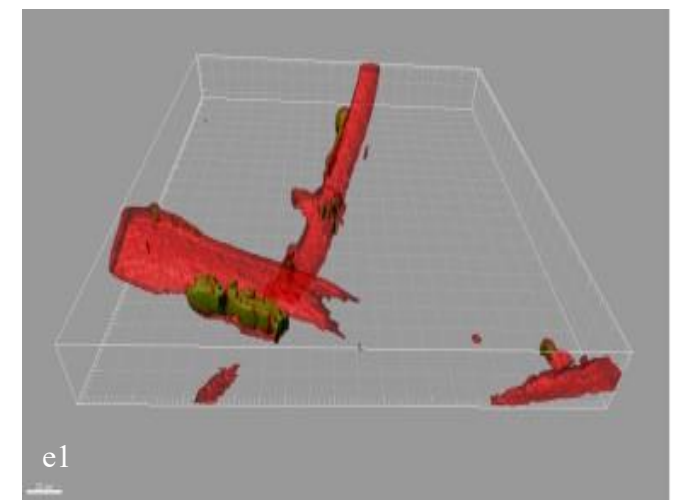
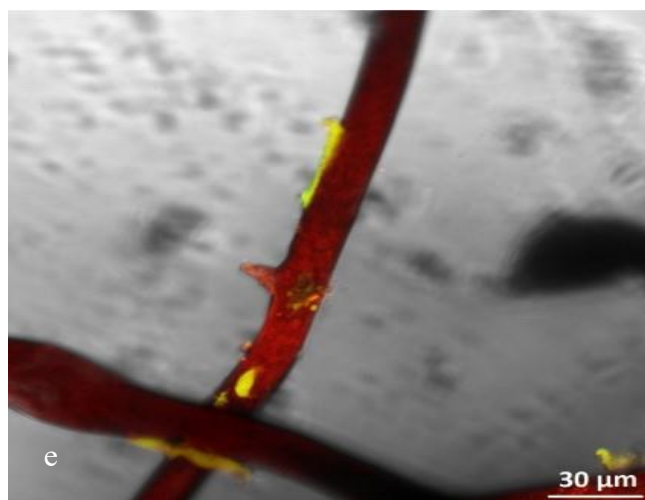
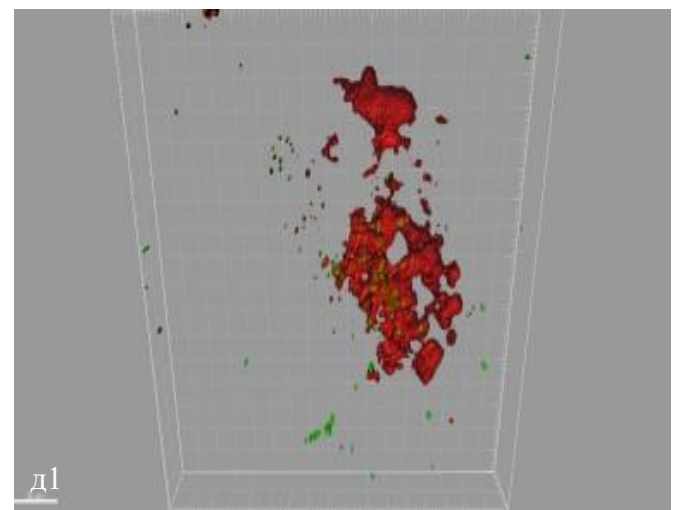
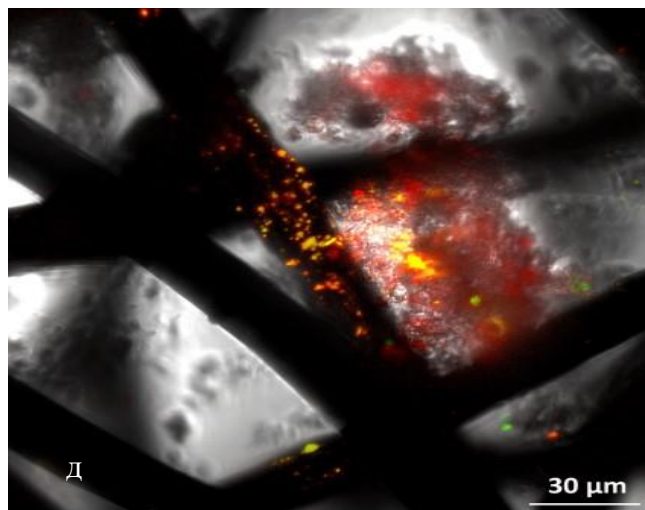
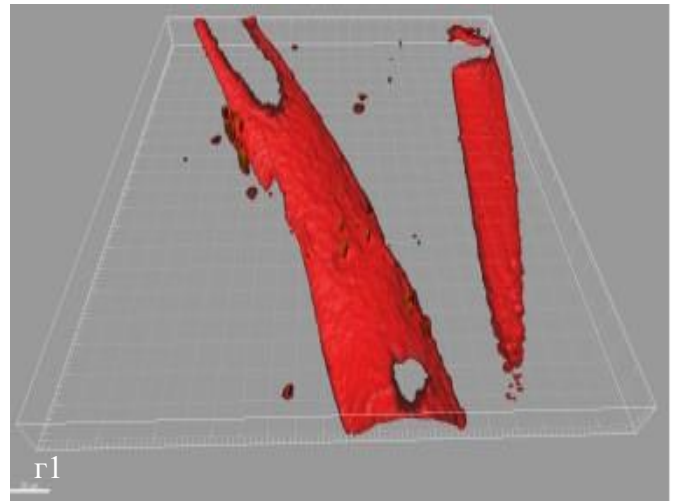
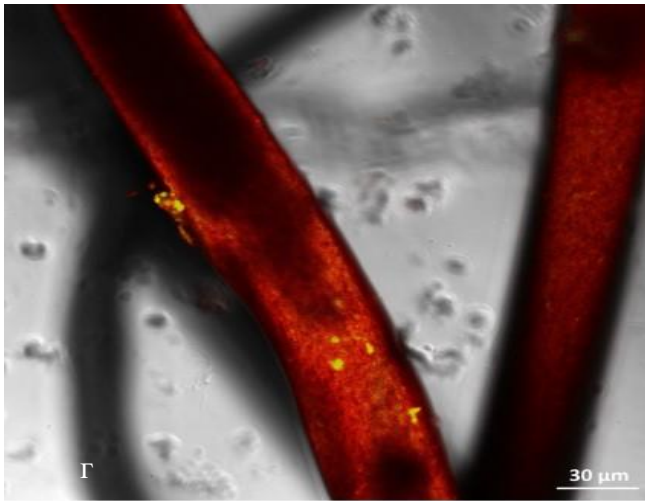
Таблица 14. Топологические параметры биопленок, полученные методом конфокальной микроскопии.

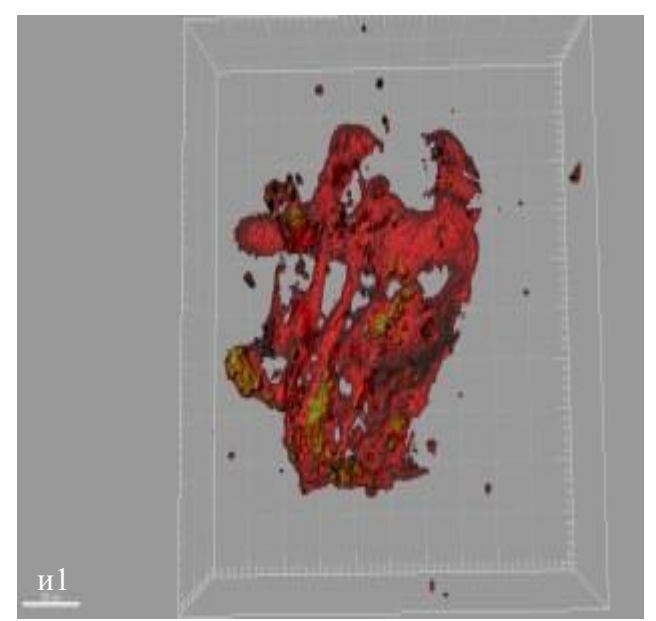
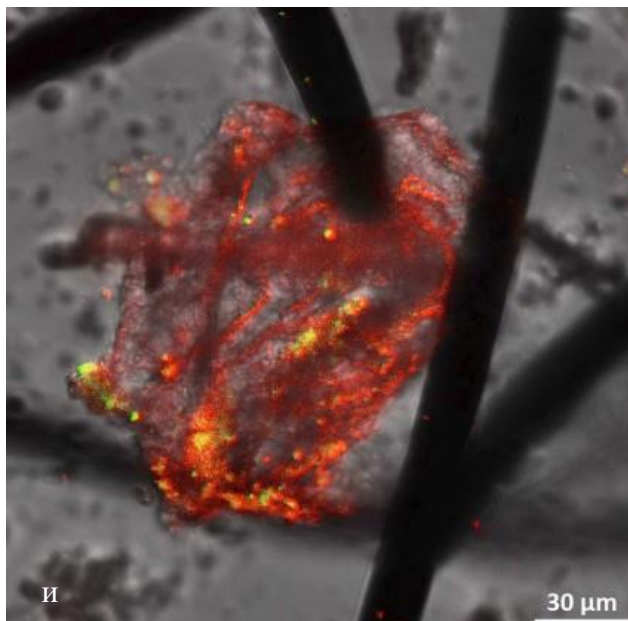
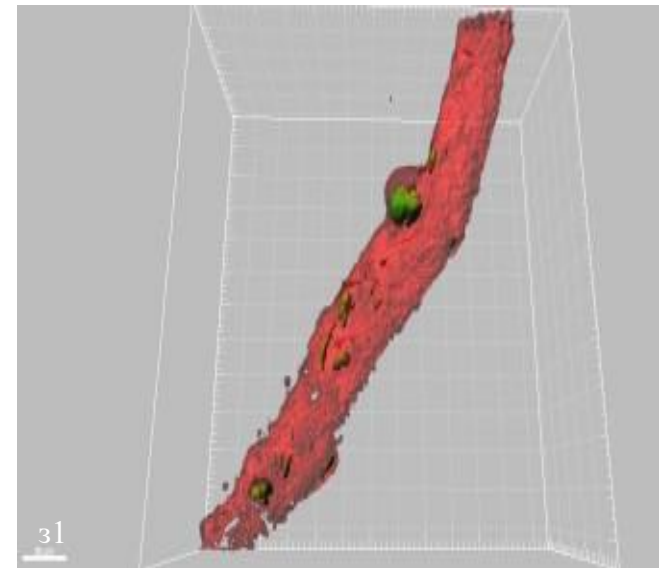
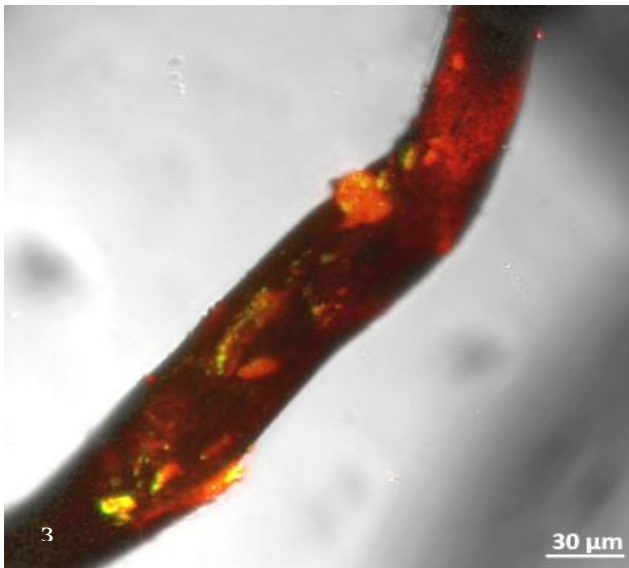
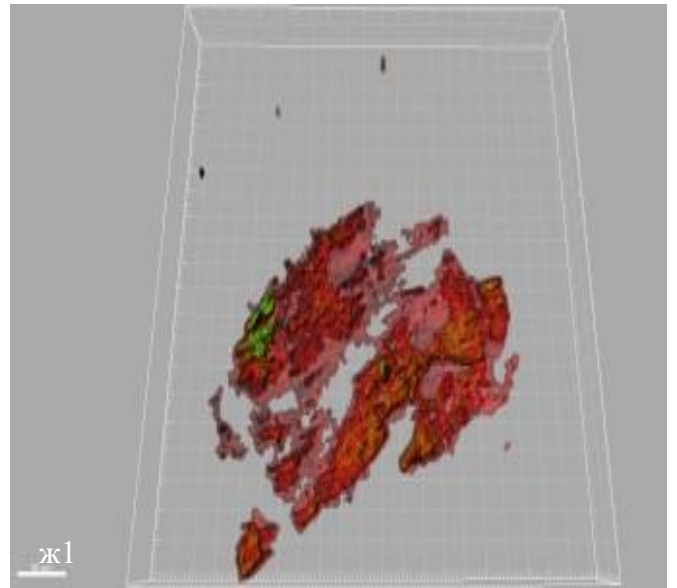
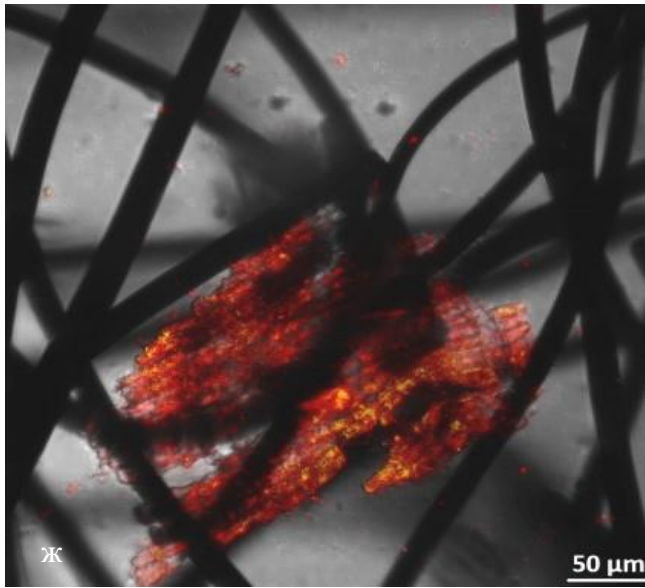
	НК (нуклеи новые кислоты ,%)	ЭПС% (пикс ² ×100% = ConA)	Общая площадь обраста ния, %	Средняя толщина , μm	Общая биомасса (μm ³ /μm ²)	Коэффиц иент шерохова тости (Ra ^x)	Отношение поверхност и к биообъему (μm ² /μm ³)
1 этап эксперимента							
КРС-КВ	1,21	26,43	27,24	7,08	8,05	0,97	0,13
КРС-ПВ	2,14	75,40	77,04	18,32	14,61	1,93	10,46
2 этап эксперимента							
КРС-КВ	1,34	25,71	26,23	10,39	10,66	1,33	0,23
КРС-ПВ	3,80	83,03	85,65	22,20	16,24	1,78	13,11
ОСВ-КВ	5,62	56,52	60,96	15,95	13,74	1,97	5,77
ОСВ-ПВ	5,24	67,00	70,09	19,00	13,92	1,83	7,94
3 этап эксперимента							
КРС-КВ	3,12	34,77	34,91	28,21	11,97	1,73	7,515
КРС-ПВ	3,76	75,19	76,39	29,54	13,09	1,76	11,28
ОСВ-КВ	6,01	41,16	42,73	17,95	9,25	1,71	6,92
ОСВ-ПВ	1,81	49,08	49,14	16,23	7,78	1,75	10,6

Среди всех изученных биопленок на втором этапе эксперимента общее количество биомассы было наибольшим для полиэфирного войлока с КРС в качестве инокулята; схожие результаты получены для биопленок на карбоновом войлоке и полиэфирном войлоке с ОСВ в качестве инокулята. Наименьший объем наблюдался у биопленки на карбоновом войлоке с КРС в качестве инокулята. Наибольшей толщиной обладала биопленка в КРС-ПВ, наименьшей – в

КРС-КВ, различие составляло почти два раза. Наблюдаемый рост биопленки в КРС-ПВ происходил вдоль и вокруг волокон, покрытие составляло до 85,7%, соотношение поверхности к объему биопленки ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$) демонстрировало высокую степень сцепления пленки с поверхностью материала (Таблица 14). Для КРС-ПВ было характерно наибольшее количество ЭПС, при относительно невысоком количестве клеток, вероятно необходимое для удержания биопленки на поверхности материала. Обрастания карбонового войлока в КРС-КВ практически не происходило: общая площадь биопленки составляла до 26,2%; количество клеток, образующих колонии и продуцирующих ЭПС-матрикс, было в 2,8 раз меньше, чем в КРС-ПВ; сцепление с поверхностью было слабое, в большей степени биопленки находились в пространстве между волокнами. Похожее пространственное расположение биопленок наблюдалось и на карбоновом войлоке в ОСВ-КВ, было отмечено прикрепление крайних участков ЭПС-матрикса к волокнам, что позволяло увеличивать площадь контакта биопленки со средой, а также влияло на поступление нутриентов во внутреннюю среду к клеткам (Рисунок 15 д). Кроме того, можно было отметить наличие микроколоний вдоль волокна, не окруженных общим матриксом, что подтверждается высоким коэффициентом шероховатости (Ra^x). Обрастание полиэфирного войлока в ОСВ-ПВ происходило по поверхности волокна, наблюдалась складчатость матрикса перпендикулярно поверхности, образующая подобие башенных структур, в которых отмечали агрегацию клеток; коэффициент шероховатости также указывал на неоднородность биопленки. Появление данных структур локально увеличивало толщину биопленки, вероятно указывая на продолжающееся созревание биопленки (Рисунок 15 е). На третьем этапе эксперимента в биопленках наблюдался дисперсионный процесс, приводящий к расселению микроорганизмов и формированию новых биообрастаний (Рисунок 15). Однако это не означает прекращение активности микроорганизмов и отмирание биообрастания. Обрастание карбонового войлока в КРС-КВ и ОСВ-КВ на третьем этапе эксперимента составляло 35 и 43%; а полиэфирного – 76 и 49% (Таблица 14). Характер биообрастания был аналогичен предыдущим этапам эксперимента: на полиэфирном войлоке обрастание шло по поверхности волокна, а на карбоновом - в межслое материала или вдоль волокна вне зависимости от типа инокулята.







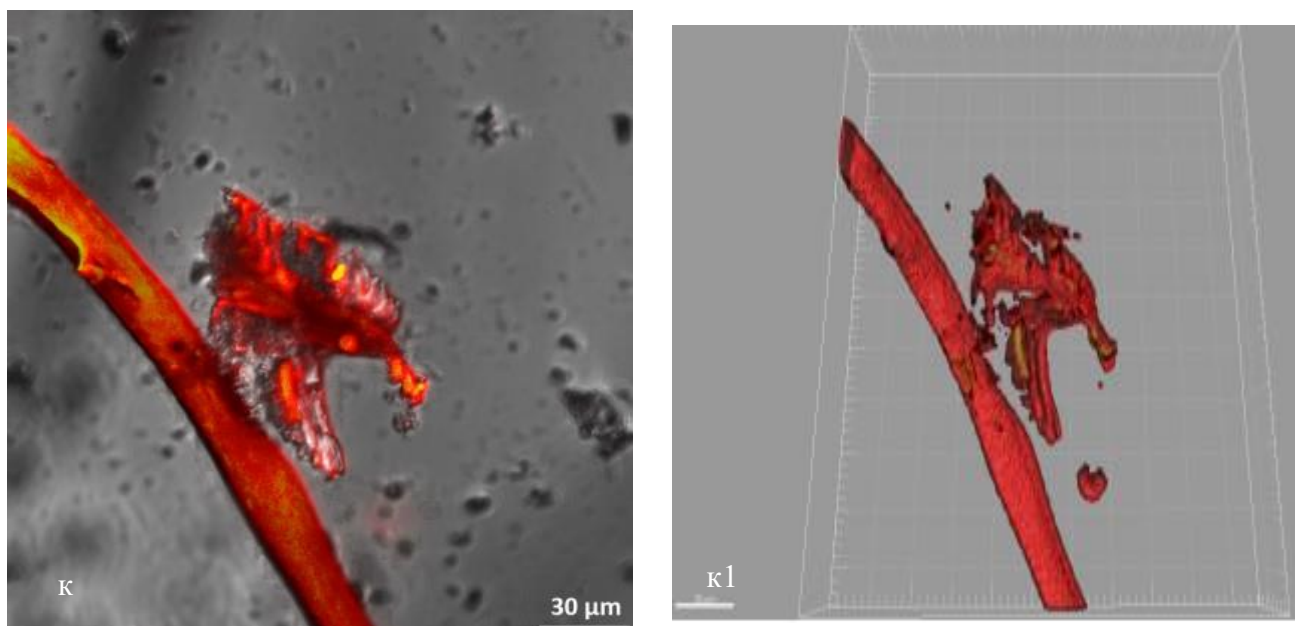


Рисунок 15. Микрофотографии конфокальной лазерной сканирующей микроскопии биопленок, образовавшихся на поверхности карбонового войлока (КРС-КВ) и полиэфирного войлока (КРС-ПВ) во флаконах, инокулированных КРС, к концу первого (а, б); второго (в,г) и третьего (ж, з) этапов эксперимента. Микрофотографии конфокальной лазерной сканирующей микроскопии биопленок, образовавшихся на поверхности карбонового войлока (ОСВ-КВ) и полиэфирного войлока (ОСВ-ПВ) во флаконах, инокулированных ОСВ, к концу второго (д, е) и третьего (и, к) этапов эксперимента. 1 - обозначает пространственное распределение нуклеиновых кислот и экзополисахаридов биопленки на поверхности соответствующих материалов. Изображения получены с помощью программы Imaris, масштаб = 15–30 мкм.

Согласно данным, полученным с использованием сканирующей и конфокальной микроскопии, можно утверждать, что карбоновый войлок был хуже подвержен обрастанию на всех этапах эксперимента, в отличие от полиэфирного войлока, в то время как сетки обрастали поверхностной биоплёнкой, которую весьма затруднительно зафиксировать при пробоподготовке. Это согласуется с предположением, что на инертном материале необходим плотный контакт клеток внутри биопленки для возможности протекания DIET через е-пили или цитохромы *c*-типа. В то же время на электропроводящем карбоновом войлоке биопленка образовывалась скорее поверхностно, что вероятно не мешало эффективно сбрасывать электроны на поверхность ЭМ, для осуществления DIET. Интересной особенностью было наличие пилеподобных структур (тонких нитей) в биопленках, обрастающих неэлектропроводящие и электропроводящие материалы. Материалы обрастали биоплёнкой, и для эффективной коммуникации внутри них микроорганизмы образовывали пилеподобные структуры, похожие на е-пили, обеспечивающие межвидовую передачу электронов в процессе DIET, однако для однозначного ответа необходимо провести дополнительные метагеномные,

метатранскриптомные и протеомные исследования (Van Steendam et al., 2019). Похожие структуры были отмечены Флорентино с соавторами на активированном угле, богатым электроактивными микроорганизмами (Florentino, et al., 2019).

4.3. Анализ микробного сообщества

Анализ микробного сообщества биопленок был проведен в конце второго и третьего этапов эксперимента. Для третьего этапа эксперимента дополнительно анализировали микробное сообщество жидкой фазы.

4.3.1. ОСВ

Основу архейного компонента сообщества смеси ОСВ и свиного навоза (ОСВин), отобранного для анализа в начале первого этапа эксперимента (нулевые сутки инкубирования), составляли метаногены рода *Methanothermobacter* и в меньшей степени *Methanosarcina* и *Methanobrevibacter*. В конце второго и третьего этапов эксперимента в биопленках на всех материалах доминировали представители рода *Methanothermobacter*, причем в контрольных флаконах без материала (ОСВ-К) и в жидких пробах третьего этапа, где анализировалась неприкрепленная биомасса, их количество было существенно выше. Клетки *Methanosarcina* и *Methanocorpusculum* также присутствовали, но в существенно меньшем количестве, особенно на сетке из стекловолокна (ОСВ-СС). Археи рода *Methanobrevibacter* к концу третьего этапа эксперимента элиминировались во всех флаконах, кроме жидкой фазы ОСВ-ССж. Представители рода *Methanobacterium* наблюдались в минорных количествах в ОСВ-К на втором и третьем этапах эксперимента. Археи рода *Methanospirillum* встречались только на карбоновом войлоке (ОСВ-КВ), а члены сем. *Methanomethylophilaceae* во всех биопленках, кроме ОСВ-К и ОСВ-СС на втором этапе эксперимента (Рисунок 16 а, в).

Микробное сообщество ОСВин обладало широким бактериальным разнообразием. Основными доминирующими бактериальными представителями были представители родов *Clostridium sensu stricto 1*, *Limosilactobacillus* и *Psychrobacter*. В меньшей степени были представлены рода *Lactococcus*, *Terrisporobacter*, *Streptococcus*, *Coprothermobacter*, *Corynebacterium*, *Turicibacter*, *Romboutsia*. После 38 суток инкубации в конце второго этапа эксперимента в бактериальном компоненте сообщества произошли изменения, в частности основными доминирующими группами во всех флаконах, за исключением флаконов с нержавеющей сталью (ОСВ-НС), стали *Coprothermobacter* и *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. Для карбонового войлока (ОСВ-КВ) было характерно присутствие рода *Limosilactobacillus*, который практически не был представлен в остальных флаконах, и отсутствие группы HN-HF0106, характерной для всех остальных флаконов. При этом *Streptococcus* и *Tepidimicrobium* были самыми многочисленными группами в ОСВ-КВ и ОСВ-ПВ. Представители групп MBA03 и собственно класса *Limnochordia* были характерны для ОСВ-НС и ОСВ-ПВ, в остальных флаконах эти группы являлись минорными. *Defluviitoga* и *Herbinix* были широко представлены как прикрепленные формы на всех материалах, причем их содержание было выше на электропроводящих материалах, а в ОСВ-К они элиминировались. Представители D8A-2, *Ruminiclostridium*, *Hungateiclostridium*, UCG-010 и *Thermoclostridium* встречались во всех флаконах довольно равномерно, но род *Defluviitalea* встречался чаще в ОСВ-К (Рисунок 16 б).

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 MBA03*. Численность представителей класса *Limnochordia* была выше в биопленках во всех флаконах, а бактерий *Candidatus Caldatribacterium*, рода *Hydrogenispora* и группы *Limnochordia MBA03* – в жидкой фазе в планктонной форме. Представители родов *Hungateiclostridium*, *Ruminiclostridium*, *Corynebacterium*, *Dethiobacteraceae uncultured*, *Tepidimicrobium* и *Acetomicrobium*, а также групп UCG-010, HN-HF0106, D8A-2 и *Clostridium sensu stricto 1* были представлены в меньшей степени (Рисунок 16 г). 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*.

Исходя из полученных данных, основной путь образования метана во всех флаконах на втором и третьем этапах эксперимента был гидрогенотрофным, что подтверждалось доминированием архей рода *Methanothermobacter* и присутствием, хотя и минорным, представителей *Methanospirillum*, *Methanobacterium*, *Methanobrevibacter* и *Methanocorpusculum*. Низкое содержание представителей рода *Methanosarcina* говорило о том, что ацетокластический путь вносил меньший вклад в образование метана (Zellner et al., 1987; Leadbetter, Breznak, 1996; Wasserfallen et al., 2000). Метилотрофные представители семейства *Methanomethylphilaceae* за счет их очень низкой представленности образовывали незначительные количества метана в сравнении с гидрогенотрофными представителями (Teoh et al., 2019).

Представители рода *Coprothermobacter* являются активными протеолитическими микроорганизмами, способными к синтрофному росту на ацетате в партнерстве с метаногенами (Lin et al., 2018). Согласно последним данным, микроорганизмы рода *Coprothermobacter* предположительно способны к сбросу электронов на электропроводящий материал и участию в процессе DIET (Gahlot et al., 2020). Представители группы *Clostridium sensu stricto* 1 являются ацетогенами и также способны проводить внеклеточный перенос электронов и восстанавливать Fe^{3+} . Согласно предположению Сяо с коллегами, данная группа микроорганизмов способна к DIET совместно с археями рода *Methanosaeta* (Xiao et al., 2019). Однако, по нашему мнению, в микробном сообществе в наших экспериментах если этот процесс и происходит, то (1) вероятно совместно с *Methanosarcina*, и (2) менее эффективно в связи с более низким средством *Methanosarcina* к субстрату (Hu et al., 2017; Park et al., 2018b; Xiao et al., 2019). Роды *Terrisporobacter* и *Turicibacter* были обнаружены в большом количестве после анаэробного сбраживания свиного навоза и являются активными ацетогенами (Xiao et al., 2019). Представители рода *Hydrogenispora* являются сахаролитиками, способными образовывать этанол, ацетат и водород и устойчивыми к аммонийному стрессу (Kougias et al., 2017; Cardona et al., 2021).

Микроорганизмы рода *Limosilactobacillus* сбраживают широкий спектр субстратов, в частности сахара до лактата и ацетата, и часто являются частью кишечной микробиоты позвоночных животных, в том числе свиней, поэтому, вероятно, были внесены вместе со свиным навозом (Li et al., 2021; Liang et al., 2021). В значительном количестве во всех флаконах были представлены целлюлозолитические бактерии рода *Ruminiclostridium* и группы *HN-HF0106*; причем их было больше всего во флаконах с СС, что вероятно говорит о том, что стекловолокно является для них удобным материалом для биообрастания. Как уже было сказано выше, данные микроорганизмы в биопленках на карбоновой ткани были самыми малочисленными, что возможно связано с особенностями данного материала (Liu et al., 2014; Ziganshina et al., 2020; Xie et al., 2021).

Можно предположить, что более высокое содержание гидролитических микроорганизмов рода *Ureibacillus* в биопленках на нержавеющей стали связано с особой способностью этих микроорганизмов к внеклеточному биосинтезу наночастиц металлов из их растворенных форм (Juibari et al., 2011; Song et al., 2019). *Candidatus* *Caldatribacterium* и *Acetomicrobium* являются бродильными бактериями, образующими ацетат (Soutschek et al., 1984; Ao et al., 2021). Согласно литературным данным, представители *Candidatus* *Caldatribacterium* могут быть потенциально синтрофными микроорганизмами (Dyksma et al., 2020). Целлюлозолитические микроорганизмы рода *Defluviitoga* и сахаролитические *Defluviitalea* также являются ацетогенами, при этом имеются данные, по которым члены рода *Defluviitoga*

способны к DIET совместно с археями рода *Methanotherix* (Jabari et al., 2012; Lin et al., 2018; Ao et al., 2021; Yang et al., 2021). Согласно некоторым исследованиям, микроорганизмы рода *Bacillus* часто обнаруживаются в микробных топливных элементах, но их роль в процессе DIET неизвестна (Ogugbue et al., 2015; Rago et al., 2018). Представители группы *Limnochordia MBA03* по последним данным могут состоять в синтрофных взаимоотношениях с археями рода *Methanosarcina*, предположительно являются CAO бактериями, однако их участие в DIET и электроактивность остаются под вопросом (Heitkamp et al., 2021; Perman et al., 2022). Бактерии группы *Clostridia D8A-2*, обнаруженные во всех флаконах, предположительно способны синтрофно разлагать ацетат, пропионат и бутират в условиях аммонийного стресса при добавлении магнетита в качестве кондуктивного материала и потенциально являются синтрофными ацетатоокисляющими (CAO) бактериями (Lee et al., 2019). К CAO также относятся микроорганизмы рода *Tepidanaerobacter* и предположительно группа *Dethiobacteraceae uncultured* (Pore et al., 2019; Hashemi et al., 2022). Представители рода *Hungateiclostridium* часто являются целлюлозолитическими микроорганизмами (Lim et al., 2020). Согласно Сю с соавторами, микроорганизмы родов *Hydrogenispora* и *Ruminiclostridium* доминируют в термофильных условиях, а *Tricibacter*, *Terrisporobacter* и *Clostridium sensu stricto 1* в мезофильных условиях в системах АС с высоким содержанием аммония, в частности с использованием свиного навоза в качестве субстрата (Xiao et al., 2021), что согласуется с нашими данными. Представители рода *Corynebacterium* являются факультативно анаэробными сахаролитическими микроорганизмами (Ziganshina et al., 2017). Высокое содержание во всех флаконах целлюлозолитических и протеолитических микроорганизмов на втором этапе эксперимента можно объяснить особенностями субстрата, богатого клетчаткой и белками.

Таким образом, состав сложившегося микробного сообщества при использовании ОСВ в качестве инокулята позволяет говорить о том, что произошла стимуляция синтрофного окисления ацетата, так как при относительно высоком содержании ацетат-продуцирующих микроорганизмов, количество ацетокластических метаногенов было значительно ниже, чем гидрогенотрофных (Dykstra et al., 2020). Также определенный вклад процесса DIET в метаногенез на втором этапе эксперимента мог осуществляться представителями наиболее многочисленных групп - *Coprothermobacter* и *Clostridium sensu stricto 1*, а на третьем этапе - представителями родов *Ureibacillus*, *Coprothermobacter*, *Candidatus Caldatribacterium* и представителями класса *Limnochordia*.

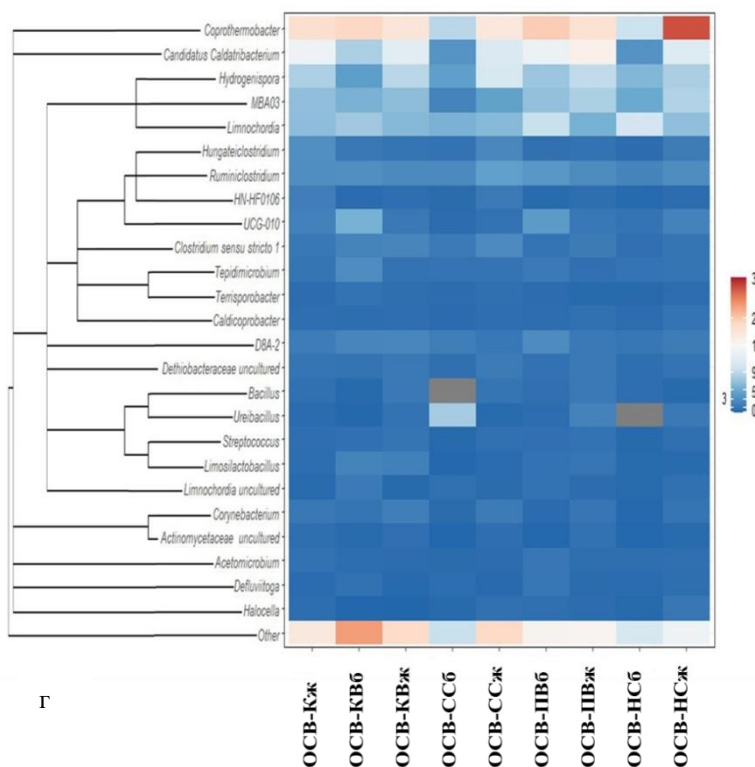
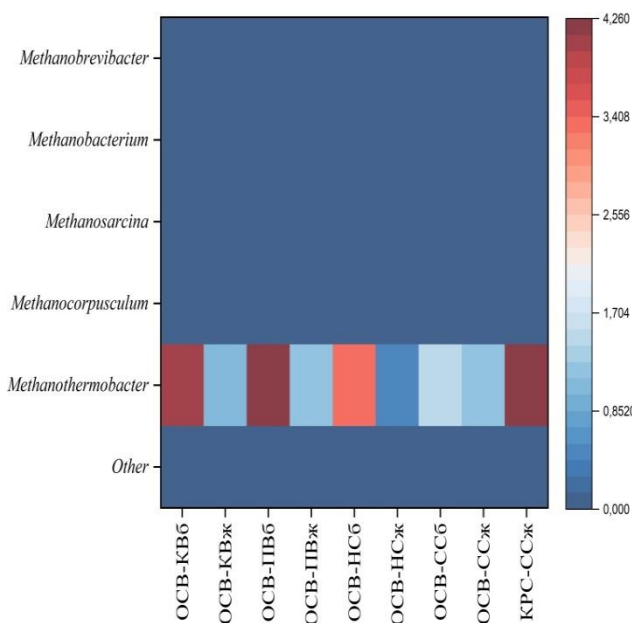
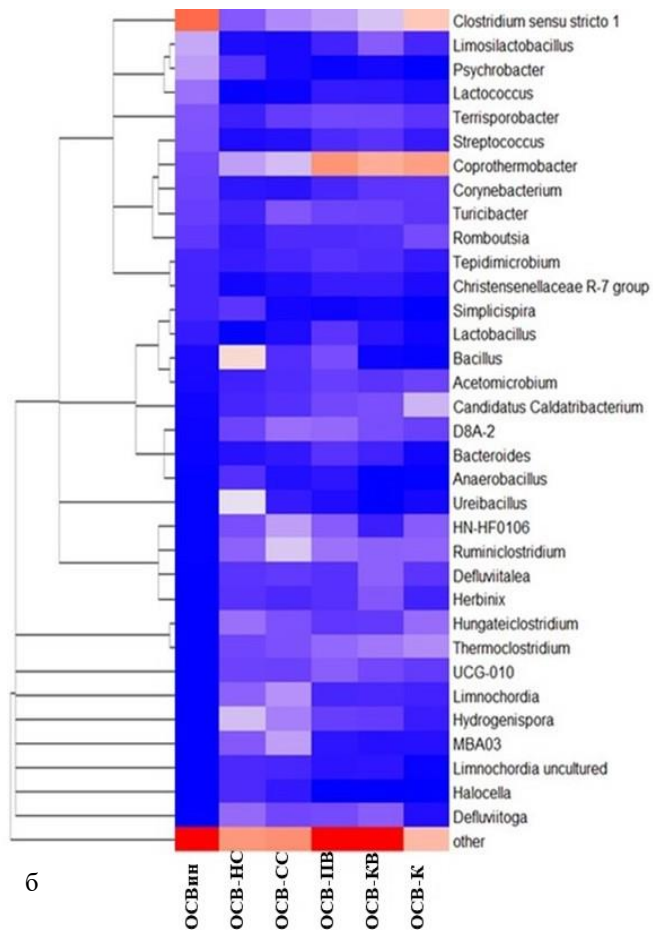
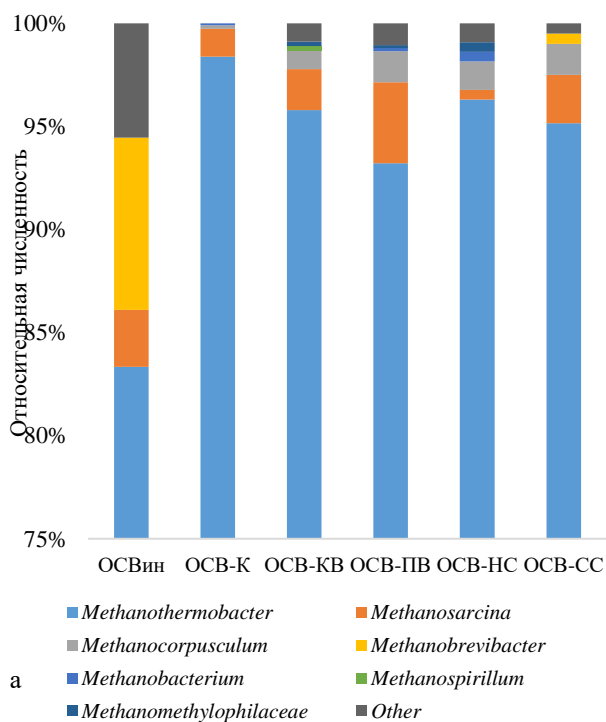


Рисунок 16. Профили архейного (а, в) и бактериального (б, г) компонентов сообществ на уровне рода при использовании ОСВ в качестве инокулята на втором (а, б) и третьем (в, г) этапах эксперимента. Для третьего этапа эксперимента сокращения ж - жидкая фаза (планктонные формы), б – биообрастание (прикрепленные формы).

4.3.2. КРС

Основу архейного компонента сообщества смеси КРС и свиного навоза (КРСин), отобранного для анализа в начале первого этапа эксперимента (нулевые сутки инкубирования), составляли метаногены *Methanothermobacter* и в меньшей степени *Methanosarcina*, *Methanobrevibacter* и *Methanosphaera*. В конце эксперимента на втором и третьем этапах во всех флаконах со всеми материалами доминировали представители рода *Methanothermobacter*. Археи родов *Methanosarcina* и *Methanobrevibacter* также присутствовали, но в существенно меньшем количестве, особенно в биопленках на нержавеющей стали (КРС-НС). Археи родов *Methanocorpusculum* содержались в минорных количествах на втором и третьем этапах эксперимента, а *Methanosphaera* - только на втором. Представители рода *Methanomassiliicoccus* присутствовали в следовых количествах в КРС-К (без добавления материалов) и в биопленке на сетке из стекловолокна (КРС-СС) на втором этапе эксперимента. Представители рода *Methanoculleus* наблюдались в минорных количествах во флаконах только на третьем этапе эксперимента (Рисунок 17 а, в).

Микробное сообщество КРСин обладало большим бактериальным разнообразием. Основными доминирующими бактериальными представителями были представители группы *Clostridium sensu stricto 1* и родов *Psychrobacter*, *Limosilactobacillus*. В меньшей степени были представлены такие рода как *Lactococcus*, *Corynebacterium*, *Acinetobacter*, *Streptococcus*, *Enterococcus*. К концу второго этапа эксперимента в бактериальном компоненте сообщества произошли существенные изменения, в частности, во всех флаконах доминировала группа *MBA03*, относящаяся к классу *Limnochordia*, сам класс *Limnochordia* и некультивируемые представители, а также представители родов *Hydrogenispora* и *Ruminiclostridium*. Интересно, что в отличие от серии экспериментов с ОСВ в качестве инокулята, представители рода *Hydrogenispora* в биопленках на электропроводящих материалах были крайне малочисленны. Представители группы *HN-HF0106* доминировали в КРС-НС и КРС-К; представители группы *Clostridium sensu stricto 1* присутствовали во всех флаконах, но больше всего их было в КРС-ПВ. Представители *Defluviitalea*, *D8A-2*, *Halocella*, *UCG-010*, *Tepidimicrobium* и *DTU014* были достаточно равномерно распределены во всех флаконах. Члены рода *Syntrophomonas* больше всего были обнаружены в КРС-КВ, а *Syntrophaceticus* – в КРС-ПВ. Содержание представителей родов *Corynebacterium*, *Romboutsia*, *Terrisporobacter* и *Streptococcus* было равномерно распределено в биопленках на карбоновом (КРС-КВ) и полиэфирном войлоке (КРС-ПВ), в остальных флаконах эти микроорганизмы были в минорных количествах. Микроорганизмы рода *Bacillus* преимущественно встречались в биопленках на неэлектропроводящих материалах (КРС-СС и КРС-ПВ). Представителей рода *Ureibacillus* было существенно больше в биопленках на нержавеющей стали, как и при использовании ОСВ в качестве инокулята (Рисунок 17 б).

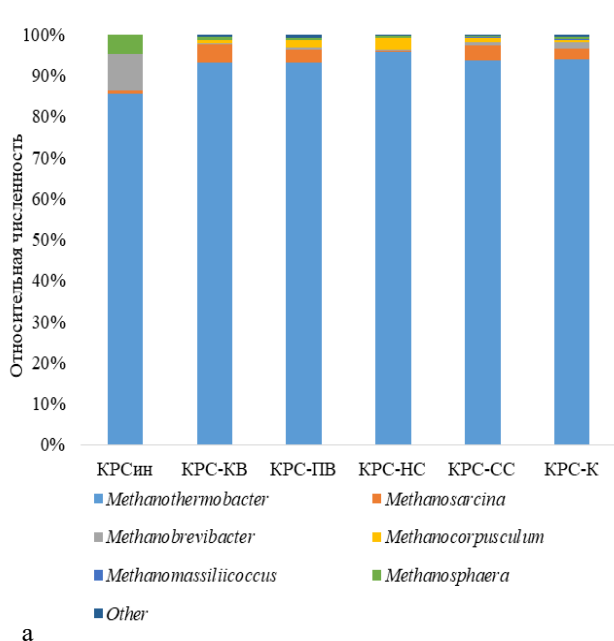
На третьем этапе эксперимента основные доминирующие представители сохранялись - род *Hydrogenispora*, класс *Limnochordia* и группа *MBA03* класса *Limnochordia* и в планктонной, и в прикрепленной формах. Микроорганизмы рода *Hydrogenispora* в жидкой фазе были более многочисленны, в сравнении с биопленками. 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 было высокое содержание прикрепленных микроорганизмов рода *Ureibacillus* (Рисунок 17 г).

Аналогично эксперименту с использованием ОСВ в качестве инокулята, основным путем образования метана на втором и третьем этапах эксперимента был гидрогенотрофный, за счет доминирования рода *Methanothermobacter* и минорных представителей *Methanobrevibacter*, *Methanocorpusculum* и *Methanoculleus* (Ziganshin et al., 2016). Ацетокластический путь, осуществляемый археями рода *Methanosarcina*, из-за низкого содержания их представителей вносил меньший вклад в образование метана. Метилотрофные представители родов *Methanosphaera* и *Methanomassiliicoccus* за счет очень низкой представленности вносили минорный вклад в метаногенез (Miller, Wolin 1995; Dridi et al., 2012).

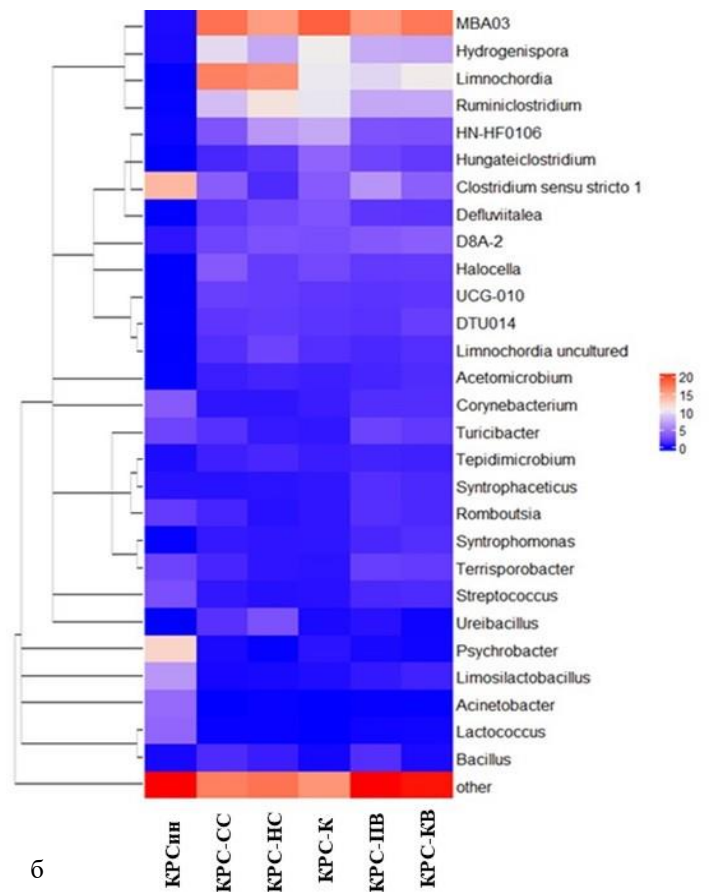
Некультивируемые представители класса *Limnochordia* кодируют гены ферментов, участвующих в обратном транспорте электронов, что позволяет предположить наличие у них способности к синтрофии (Nobu et al., 2020). Целлюлозолитические этанол-продуцирующие бактерии рода *Ruminiclostridium* имеют специальный мультиферментный комплекс, называемый целлюлосомой, который используется для расщепления сложных углеводов (Liu et al., 2014; Ziganshina et al., 2020; Ao et al., 2021). Представители рода *Hydrogenispora*, являясь сахаролитиками, способными образовывать этанол, ацетат и водород, устойчивы к аммонийному стрессу и вероятно, способны к синтрофному взаимодействию с метаногенными археями (Cardona et al., 2021). Микроорганизмы рода *Syntrophaceticus* являются подтвержденными САО бактериями (Dykstra et al., 2020). Представители групп предположительно САО бактерий *D8A-2* и потенциально электрогенных *DTU014* наблюдались во всех флаконах, что вероятно указывает на возможность протекания различных типов DIET, например, за счет плотного контакта клеток (Lee et al., 2019). Представители рода *Syntrophomonas* - анаэробные нефототрофные микроорганизмы, способные синтрофно окислять жирные кислоты до ацетата или смеси ацетата и пропионата (McInerney et al., 1981). Бактерии группы *HN-HF0106* являются целлюлозолитиками, которые могут использовать целлюлозу в качестве единственного источника углерода и энергии, при этом продуцируя H_2 и ацетат (Xie et al., 2021), а рода *Clostridium sensu stricto 1* - ацетогенами и вероятно способны участвовать в

DIET (Hu et al., 2017; Xiao et al., 2019). При использовании ОСВ в качестве инокулята бактерии рода *Ureibacillus* также накапливались в биопленках на нержавеющей стали. Бактерии родов *Terrisporobacter* и *Turicibacter* являются активными ацетогенами (Xiao et al., 2019). Микроорганизмы родов *Bacillus* и *Corynebacterium* были, вероятно, привнесены из свиного навоза, что согласуется с данными Раго и соавторов (Rago et al., 2018). Микроорганизмы рода *Corynebacterium* могут превращать углеводы в органические кислоты и участвовать в окислении ацетата (Veit et al., 2009). Сахаролитические бактерии рода *Defluviitalea* являются ацетогенами (Jabari et al., 2012). Представители рода *Halocella* являются целлюлозолитиками и ацетогенами, а рода *Tepidimicrobium* - ацидогенами (Kim et al., 2018). Представители рода *Hungateiclostridium* часто являются целлюлозолитическими микроорганизмами (Lim et al., 2020). Большое количество целлюлозолитических и протеолитических микроорганизмов на втором этапе эксперимента можно объяснить особенностями субстрата, богатого белками и клетчаткой.

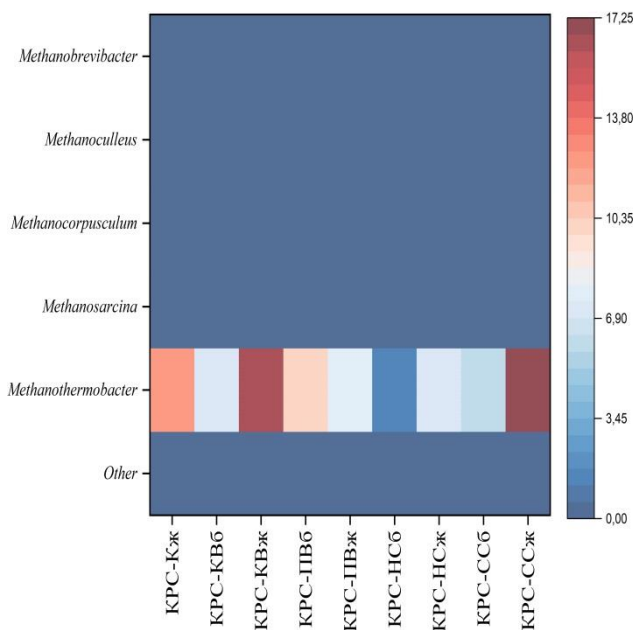
Таким образом, аналогично результатам эксперимента с использованием ОСВ в качестве инокулята, часть микробного сообщества составляли микроорганизмы родов *Hydrogenispora*, *Ruminiclostridium* и *Hungateiclostridium*. Однако основу сообщества на втором и третьем этапах эксперимента составила интересная группа микроорганизмов *MBA03*, класса *Limnochordia*, которые, вероятно, могут осуществлять синтрофный метаболизм. Вероятно, во флаконах произошла стимуляция процесса САО, так как при относительно высоком содержании ацетатпродуцирующих микроорганизмов, количество ацетокластических метаногенов было значительно ниже, чем гидрогенотрофных, аналогично полученным результатам с ОСВ в качестве инокулята (Dyksma et al., 2020). Однако на втором этапе эксперимента в биопленках КРС-НС, а на третьем в КРС-ПВ, вероятно, протекали разные типы DIET, за счет присутствия группы *MBA03* класса *Limnochordia*, что согласуется с кинетическими параметрами метаногенеза.



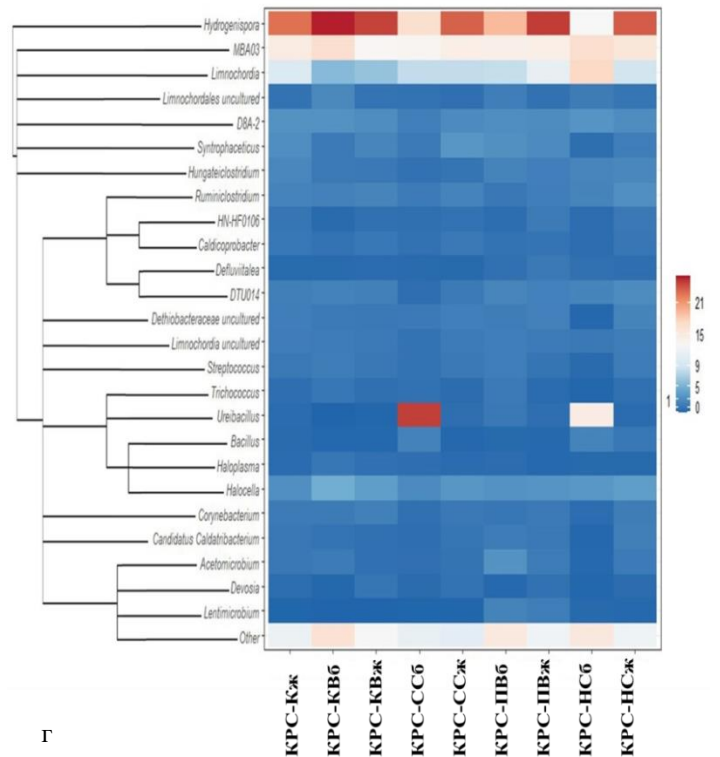
а



б



в



г

Рисунок 17. Профили архейного (а, в) и бактериального (б, г) сообществ на уровне рода при использовании КРС в качестве инокулята на втором (а, б) и третьем (в, г) этапах эксперимента. Для третьего этапа эксперимента сокращения ж – жидкая фаза (планктонные формы), б – биообращение (прикрепленные формы).

Основные результаты и выводы по Главе 4.

Исходя из полученных данных в ходе эксперимента по термофильному анаэробному сбраживанию низкоконцентрированного стока и смеси летучих жирных кислот в высокой концентрации, можно предположить, что любой носитель с большой площадью и удобной для биообрастания поверхностью улучшает параметры анаэробного сбраживания. Однозначно утверждать о протекании процесса прямого межвидового переноса электронов нельзя. Однако по ряду параметров, в частности, по совокупности кинетических, микроскопических, а также молекулярных данных о микробном сообществе, можно было увидеть интересную корреляцию между характеристиками процесса АС и наличием пилеподобных структур в биопленках (особенно на полиэфирном войлоке) на втором и третьем этапах эксперимента. Это может говорить о протекании DIET с е-пилями и о его определенном вкладе в улучшение характеристик метаногенеза для флаконов с полиэфирным войлоком и ОСВ на втором этапе эксперимента и с КРС на третьем. DIET с электропроводящими материалами вероятно протекал в биопленке, образовавшейся на сетке из нержавеющей стали с КРС в качестве инокулята на втором этапе эксперимента и на сетке из нержавеющей стали и карбоновом войлоке с ОСВ в качестве инокулята на третьем этапе. При этом *MBA03* класса *Limnochordia* видимо была основной группой микроорганизмов, отвечающей за осуществление DIET и на втором и на третьем этапах эксперимента для флаконов с КРС. Для флаконов с ОСВ представители родов *Coprothermobacter* и/или *Clostridium sensu stricto 1* на втором этапе эксперимента и родов *Ureibacillus*, *Coprothermobacter*, *Candidatus Caldatribacterium* и класса *Limnochordia* на третьем этапе эксперимента, вероятно, являются микроорганизмами, играющими основную роль в DIET.

Фактически, специфичность инокулята проявляется в комплементарности к определенному материалу для биообрастания и типу субстрата, что особенно заметно на третьем этапе эксперимента. Несмотря на то, что исследования по вкладу процесса DIET 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 DIET, выражающаяся в небольшом улучшении параметров сбраживания, увеличении выхода метана и общей стабилизации процесса. В то же время, стимуляция DIET 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.

Глава 5. Влияние электропроводящей карбоновой ткани и инертной ткани из стекловолокна на характеристики анаэробного сбраживания при высокой нагрузке по органическому веществу (Эксперимент 2)

В данном разделе исследовалось влияние электропроводящего материала в сравнении с неэлектропроводящим аналогом при высокой нагрузке по ОВ в реакторе повышенного объёма для понимания возможности масштабирования результатов.

5.1. Характеристика анаэробного сбраживания

5.1.1. Образование метана и биогаза

В начале эксперимента при изменении субстрата с ОСВ на смесь ОСВ и ОФ-ТКО происходила адаптация микробного сообщества реакторов, что характеризовалось нестабильным выходом метана. Однако после полной смены объёма реактора (7 суток) скорость образования метана и другие характеристики процесса стабилизировались. Увеличение нагрузки по органическому веществу сопровождалось пропорциональным увеличением скорости образования биогаза и метана. Согласно U-критерию Манна–Уитни в качестве post-hoc теста с поправкой Сидака на множественные сравнения, различия в выходе биогаза между R1, R2 и R3 статистически достоверны на всех стадиях процесса, а между R2 и R3 только при нагрузке 12,12 кг ОВ/(м³ сутки) (Рисунок 18). Так, при нагрузке 2,4 кг ОВ/(м³ сутки) выход биогаза у реакторов R2 и R3 выше, чем у R1, на 9,94% и 5,9%; при нагрузке 4,42 кг ОВ/(м³ сутки) - на 12,16% и 11,5%; при нагрузке 8,66 кг ОВ/(м³ сутки) - на 11,15% и 8,97%, а при нагрузке 12,12 кг ОВ/(м³ сутки) - на 4,95% и 8,97%, соответственно. При нагрузке 12,12 кг ОВ/(м³ сутки) статистически достоверна разница между реакторами R2 и R3, где выход биогаза у R3 выше на 4,24% (Рисунок 18). Различия в величинах выхода метана были статистически достоверными между R1, R2 и R3 при нагрузках от 4,42 до 12,12 кг ОВ/(м³ сутки), а между R2 и R3 только при нагрузке 12,12 кг ОВ/(м³ сутки) (Рисунок 19). При нагрузке 4,42 кг ОВ/(м³ сутки) выход метана у реакторов R2 и R3 был выше, чем у R1 на 9,44% и 9,54%; при нагрузке 8,66 кг ОВ/(м³ сутки) - на 13,44% и 11,9%, а при нагрузке 12,12 кг ОВ/(м³ сутки) - на 8,38% и 13,24%, соответственно. При нагрузке 12,12 кг ОВ/(м³ сутки) разница между реакторами R2 и R3 была статистически достоверна; выход биогаза у R3 был выше на 5,3% (Рисунок 19).

Выход биогаза

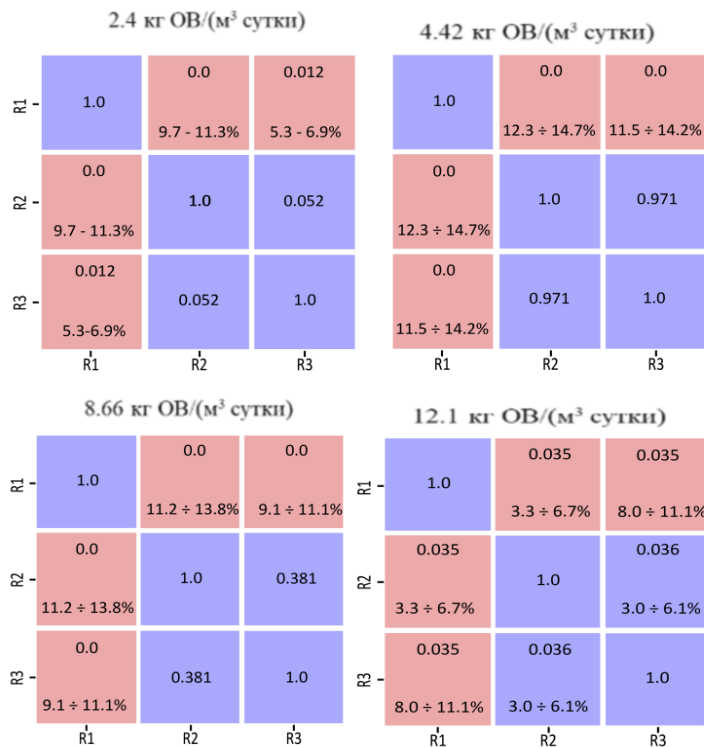
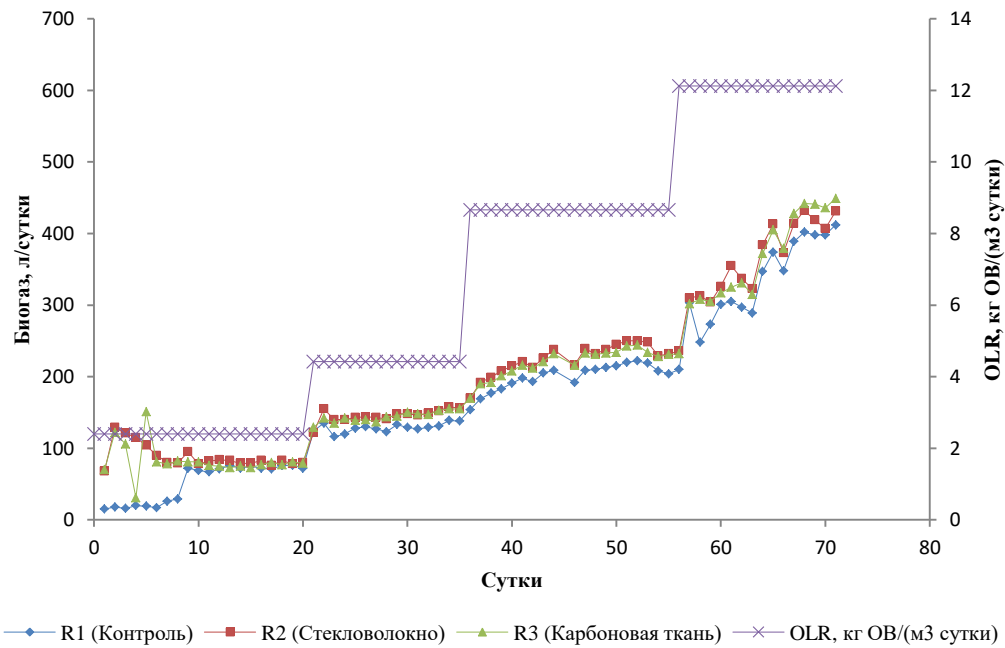


Рисунок 18. Динамика образования биогаза и статистически значимые различия реакторов R1, R2 и R3. N-test и U-критерий Манна - Уитни в качестве post-hoc теста с поправкой Сидака для нагрузки 2,4; 4,42; 8,66; и 12,12 кг ОВ/(м³ сутки). Для реакторов, значимо отличающихся друг от друга (красные квадраты), наряду с p-значениями представлены медианные доверительные интервалы различий в абсолютной, а также в относительной величинах.

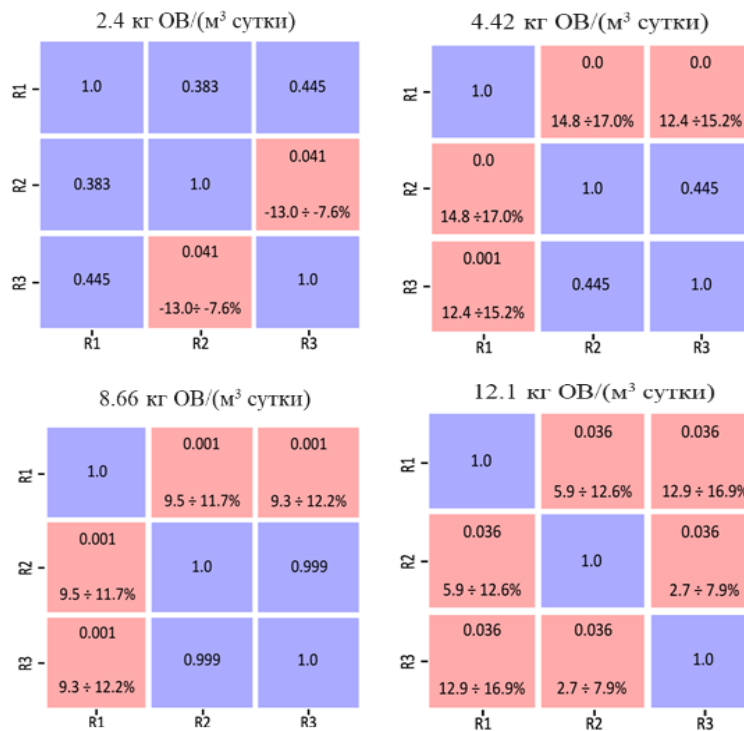
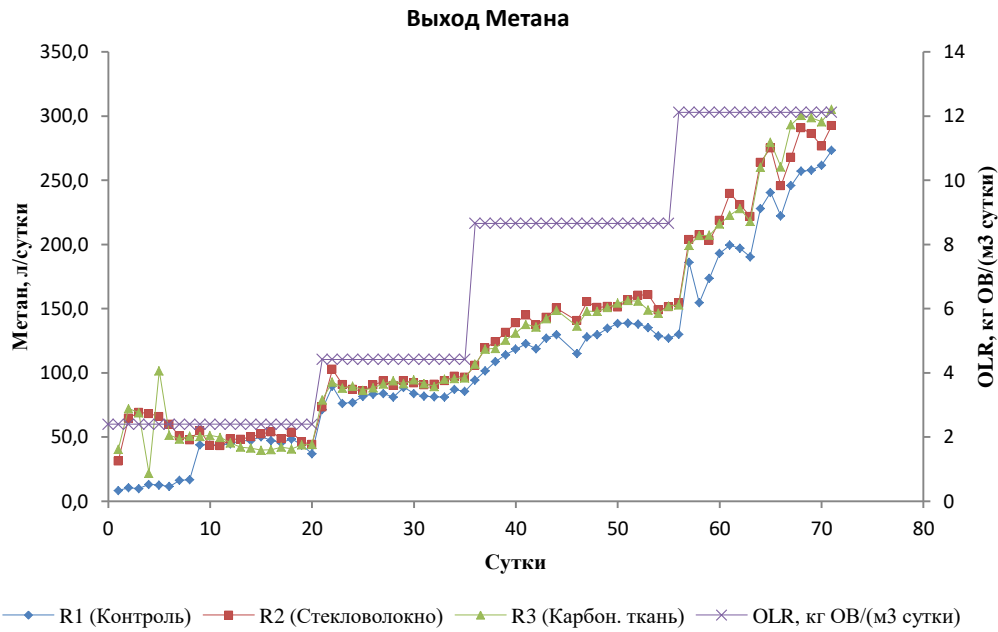


Рисунок 19. Динамика образования метана и статистически значимые различия реакторов R1, R2 и R3. Н-test и U-критерий Манна – Уитни в качестве post-hoc теста с поправкой Сидака для нагрузки 2,4; 4,42; 8,66; и 12,12 кг ОВ/(м³ сутки). Для реакторов, значимо отличающихся друг от друга (красные квадраты), наряду с р-значениями представлены медианные доверительные интервалы различий в абсолютной, а также в относительной величинах.

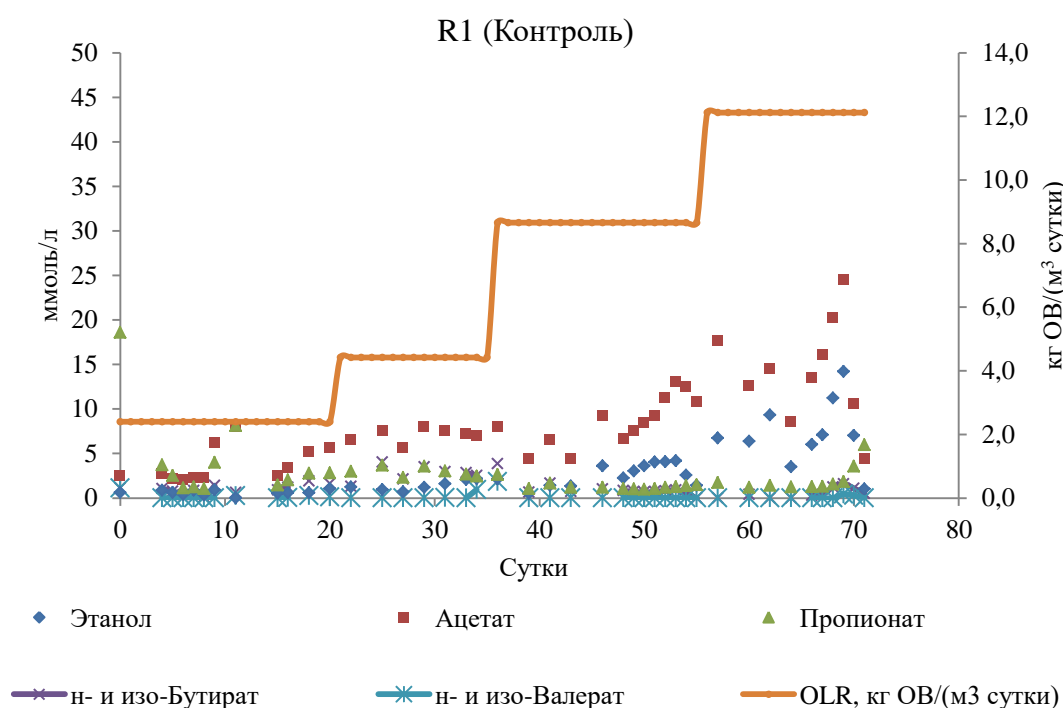
В литературе ранее исследовалось совместное сбраживание модельной органической фракции ТКО с ОСВ в мезофильном 150 л реакторе с нагрузкой по органическому веществу от 1 до 10 кг ОВ/(м³ сутки). Процесс был стабилен при нагрузке до 8 кг ОВ/(м³ сутки). В нашем исследовании процесс шел в термофильных условиях в реакторе объемом 90 л и был стабилен при нагрузке 12,12 кг ОВ/(м³ сутки), что вероятно связано с более оптимальными подобранными условиями, соотношением субстратов и эффективным биопленкообразованием на носителях (Kumäläinen et al., 2012; Tuagi et al., 2018). В исследовании Кавинато с соавторами показано, что при переходе из мезофильных условий (37°C) в термофильные (55°C) при анаэробном совместном сбраживании ОСВ и биоотходов в реакторе объемом 380 л удельная продукция биогаза увеличивалась с 0,34 до 0,49 м³/кг ОВ, а газообразование – с 0,53 до 0,78 м³ на м³ реактора в сутки, максимальная нагрузка составила 2,21 кг ОВ/(м³ сутки) (Cavinato et al., 2013). Это согласуется с нашими данными об эффективности и стабильности анаэробного процесса совместного сбраживания ОСВ и ОФ-ТКО в термофильных условиях.

5.1.2. Динамика образования и потребления ЛЖК, удаление органического вещества, изменение рН

При переходе биореакторов на максимальную нагрузку 12,12 кг ОВ/(м³ сутки), степень удаления органического вещества в эффлюенте падала с 67-70% до 56±1% (Таблица 15) для всех реакторов, однако ожидаемого закисления сбраживаемой массы не наблюдали. Добиться еще большего повышения нагрузки с помощью увеличения содержания ОФ-ТКО в субстратной смеси не представлялось возможным, т.к. влажность субстратной смеси снижалась до 93% и менее, что делало невозможным поддержание требуемого гидравлического режима в биореакторе (происходила закупорка трубопроводов). Тем не менее, при максимальной нагрузке начало проявляться положительное влияние присутствия электропроводящего материала на характеристики процесса анаэробного сбраживания. Накопление ЛЖК было самым низким для R3 на всех стадиях процесса, кроме третьей, с нагрузкой 8,66 кг ОВ/(м³ сутки), однако с нагрузкой 12,12 кг ОВ/(м³ сутки), общая концентрация ЛЖК для R3 была ниже на 45% и 12%, чем для R1 и R2 (Рисунок 20). Добавление материала носителя, особенно электропроводящего, такого как карбоновая ткань, стабилизировало процессы, в том числе за счет поддержания более высокого рН.

Таблица 15. Характеристики процесса метаногенного сбраживания в анаэробных биореакторах.

Параметры АС	Реактор	OLR кг ОВ/(м ³ 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 _{конечн} , 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



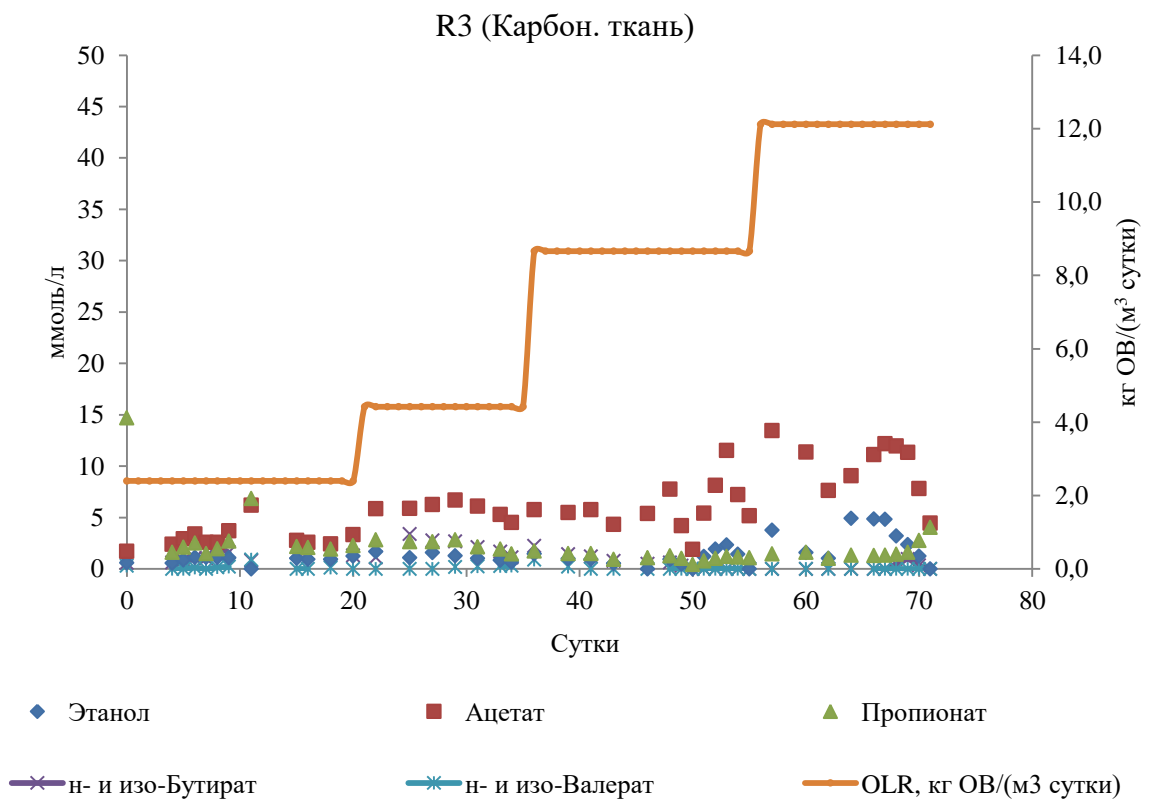
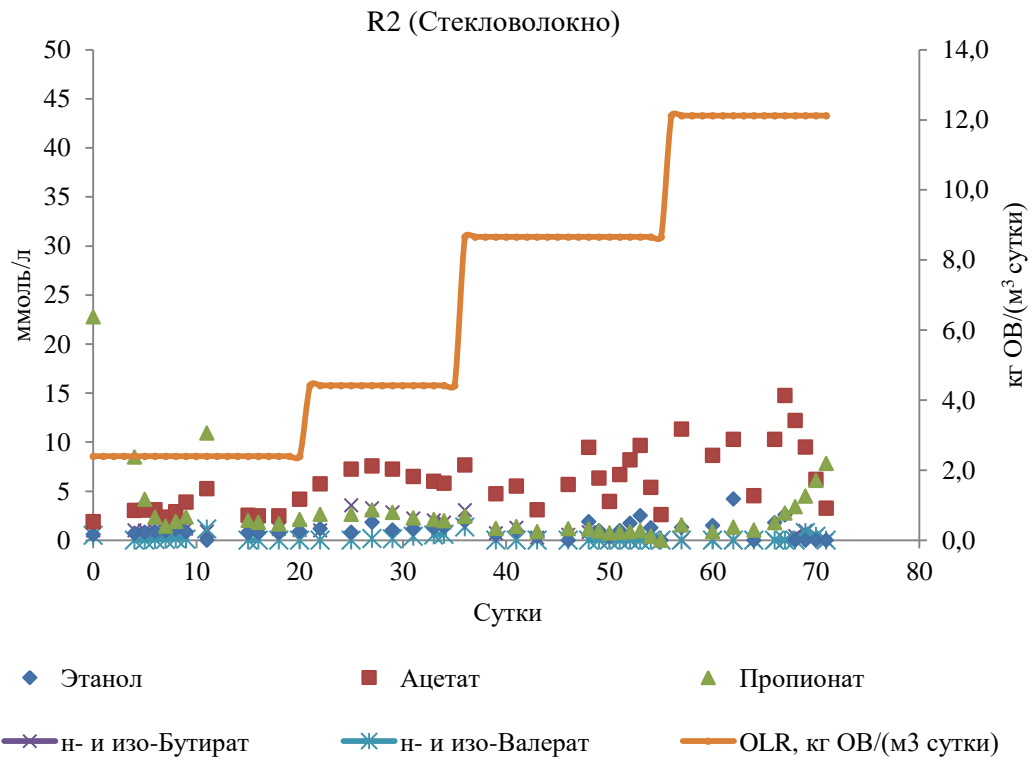


Рисунок 20. Динамика концентрации ЛЖК при АС смеси ОСВ и ОФ-ТКО в реакторах R1, R2 и R3

Удаление органического вещества на уровне 72-75% было описано в литературе при совместном сбраживании модельной ОФ-ТКО с ОСВ в мезофильном 150 л реакторе с нагрузкой по органическому веществу 8 кг ОВ/(м³ сутки), что согласуется с полученными нами результатами для нагрузки 8,66 кг ОВ/(м³ сутки), таблица 14 (Kumäläinen et al., 2012). При совместном сбраживании ОФ-ТКО и ОСВ на термофильной стадии в непрерывных условиях в системе температурно-фазового АС, удаление ОВ составило 28,40 ± 6,17% при нагрузке 21,35 кг ОВ/(м³ сутки), и 26,67 ± 7,30% при нагрузке 44,57 ± 5,08 кг ОВ/(м³ сутки) (Bogowski, 2015). Согласно нашим экспериментальным данным, повышение нагрузки до 12,12 кг ОВ/(м³ сутки) снижало степень удаления органического вещества до 56±1% для всех реакторов. В целом это соотносится с тем фактом, что при увеличении нагрузки скорость образования биогаза возрастает, но падает удельный выход биогаза и степень удаления ОВ.

5.2. Анализ микробного сообщества

В этом исследовании для изучения состава микробного сообщества реакторов использовалось высокопроизводительное секвенирование Illumina MiSeq. Было проанализировано 2244 ОТЕ. Как правило, индекс Чао характеризует богатство сообщества, а индексы Шеннона и Симпсона характеризуют разнообразие сообщества. Индекс Чао был самым высоким для R3 и самым низким для R2, при сравнении прикрепленных форм наблюдалась аналогичная картина (Таблица 16).

Таблица 16. Диапазон насыщенности и индексы альфа-разнообразия и оценочные значения (среднее значение ± SD), для R1, R2 и R3, проанализированные в течение эксперимента, для инокулята – в начале, для биопленок – в конце.

Пробы	ОТЕ	Индекс богатства	Индексы разнообразия	
		Чао 1	Шеннон	Симпсон
Инокулят	653	653,9	5,52	0,062
R1 (Контроль)	649-895	650,5-896,4	4,14-5,73	0,059-0,186
	776,0±83,2	777,29±83,19	4,92±0,47	0,111±0,036
R2(Стекловолокно)	713-858	714,9-858,9	4,10-5,66	0,058-0,187
	771,5±51,6	772,78±51,23	4,91±0,51	0,107±0,040
R3 (Карбон)	657-875	658,3-875,9	3,47-5,31	0,086-0,277
	777,1±70,6	778,44±70,53	4,62±0,63	0,135±0,062
R2 биопленка	370	373,6	2,91	0,313
R3 биопленка	607	607,7	4,4	0,140

*Курсивом выделены средние значения ± SD. В первой строке перечислены значения диапазона

Индекс Шеннона был самым низким для R3 для микроорганизмов в планктонной форме, но более высоким для прикрепленных форм в сравнении с R2, что говорит о более высоком

разнообразии прикрепленных форм (Fernandes et al., 2018; Yan et al., 2021). Индексы разнообразия Шеннона и Симпсона для реакторов R1 и R2 для планктонных форм микроорганизмов были очень близки и не несли значительных отличий.

5.2.1. Инокулят

Общее количество копий ДНК для бактерий в инокуляте составляло $2,5 \times 10^8$ на мл пробы, для архей - $1,9 \times 10^7$ на мл пробы. Основными доминирующими бактериальными представителями в инокуляте были члены родов *Parcubacteria*, *Cloacibacillus*, *Vampirovibrio*, *Defluviitoga* *Coprothermobacter* и *Clostridium* XIVa, часть которых, в частности *Parcubacteria*, *Cloacibacillus*, *Vampirovibrio* и *Clostridium* XIVa, полностью или практически полностью элиминировались и заменялись другими родами в ходе эксперимента. Археи инокулята были представлены метаногенами родов *Methanothermix*, доля которого составляла более 80%, и *Methanothermobacter* – около 14%, представители рода *Methanocorpusculum* и *Methanosarcina* составляли минорную часть архейного компонента сообщества.

5.2.2 R1

В ходе работы реакторов происходили изменения в составе планктонного микробного сообщества по сравнению с инокулятом. Для реактора R1 количество копий ДНК бактерий в ходе эксперимента постепенно возрастало и к концу достигало $7,1 \times 10^9$ на мл пробы; количество копий ДНК для архей в конце эксперимента составляло $2,1 \times 10^8$ на мл пробы. В процессе работы реактора, состав микробного сообщества сильно изменился в сравнении с инокулятом. Доминирующим видом метаногенных архей к концу эксперимента стал *Methanothermobacter*, причем соотношение *Methanothermobacter* и *Methanothermix* менялось в зависимости от нагрузки в ходе эксперимента. Так при нагрузке 2,4 и 12,12 кг ОВ/(м³ сутки) доминировали представители рода *Methanothermobacter*, а при 8,66 кг ОВ/(м³ сутки) - представители рода *Methanothermix*. Количество микроорганизмов рода *Methanosarcina* постепенно нарастало при нагрузке 12,12 кг ОВ/(м³ сутки), а *Methanolinea* - при 8,66 кг ОВ/(м³ сутки). Археи рода *Methanocorpusculum* элиминировались из реактора. Для бактериального компонента микробного сообщества в планктонной форме основными доминирующими родами были *Anaerobaculum*, *Coprothermobacter*, *Clostridium* III, *Defluviitoga* и *Fervidobacterium*. В ходе повышения нагрузки, количество представителей рода *Anaerobaculum* постепенно снижалось, а *Clostridium* III наоборот повышалось, с небольшим снижением при нагрузке 8,66 кг ОВ/(м³ сутки). Представители рода *Coprothermobacter* активно нарастали при нагрузках 2,4 и 12,12 кг ОВ/(м³ сутки), а представители *Fervidobacterium*, наоборот, существенно увеличивали свою численность при нагрузке 8,66 кг ОВ/(м³ сутки). Микроорганизмы рода *Defluviitoga* постепенно увеличивали численность в ходе эксперимента, однако к концу эксперимента, она значительно снизилась. Представители рода *Bifidobacterium* в начале эксперимента являлись одним из

доминирующих родов, однако при повышении нагрузки постепенно элиминировались, это было характерно для всех трех реакторов. Микроорганизмы рода *Soehngenia* начинали активно увеличивать численность при нагрузке 8,66 кг ОВ/(м³ сутки), а затем она снижалась, но в конце эксперимента опять начинала увеличиваться (Рисунок 21).

5.2.3. R2

Количество копий ДНК бактерий в ходе эксперимента постепенно возрастало и к концу достигало $4,6 \times 10^9$ на мл пробы, количество копий ДНК архей в конце эксперимента составляло $2,1 \times 10^8$ на мл пробы. Доминирующим родом метаногенных архей к концу эксперимента стал *Methanothermobacter*, его численность постепенно повышалась в ходе эксперимента, а представителей рода *Methanothrix* наоборот снижалась. Количество представителей рода *Methanosarcina* при нагрузке 8,66 кг ОВ/(м³ сутки) нарастало, затем их численность опять снижалась, однако при повышении нагрузки до 12,12 кг ОВ/(м³ сутки) возрастала. Представители рода *Methanolinea* присутствовали только при нагрузке 8,66 кг ОВ/(м³ сутки), затем постепенно элиминировались из сообщества.

В бактериальном компоненте планктонного микробного сообщества основными доминирующими родами были *Anaerobaculum*, *Coprothermobacter*, *Clostridium III*, *Defluviitoga* и *Ferrihydrobacterium*. Количество представителей рода *Anaerobaculum* при повышении нагрузки до 2,4 кг ОВ/(м³ сутки) нарастало, а затем постепенно снижалось с небольшими отклонениями. Микроорганизмы рода *Coprothermobacter* сначала постепенно снижали свою численность, а при повышении нагрузки до 12,12 кг ОВ/(м³ сутки) наоборот, увеличивали, становясь основным доминирующим родом на конец эксперимента. *Clostridium III* и *Ferrihydrobacterium* активно развивались в реакторе при нагрузке 8,66 кг ОВ/(м³ сутки), однако при дальнейшем повышении, постепенно снижали свою численность. Род *Defluviitoga* в ходе всего эксперимента постепенно повышал численность микроорганизмов, однако при нагрузке 12,12 кг ОВ/(м³ сутки) число представителей стало снижаться (Рисунок 21).

5.2.4. R3

Количество копий ДНК бактерий в ходе эксперимента постепенно увеличивалось и к концу эксперимента достигало $6,1 \times 10^9$, для архейной составляющей сообщества конечное значение составляло $1,4 \times 10^8$. Аналогично R2, доминирующим видом метаногенных архей к концу эксперимента стал *Methanothermobacter*, его численность постепенно повышалась в ходе эксперимента, а представителей рода *Methanothrix* наоборот снижалась. Количество представителей рода *Methanosarcina* при нагрузке 8,66 кг ОВ/(м³ сутки) нарастало, затем их численность повышалась и понижалась волнообразно. Представители рода *Methanolinea* присутствовали только при нагрузке 8,66 кг ОВ/(м³ сутки), затем постепенно элиминировались

из реактора. В бактериальном компоненте планктонного микробного сообщества, доминирующими родами были *Anaerobaculum*, *Coprothermobacter*, *Clostridium III*, *Defluviitoga* и *Fervidobacterium*. Представители рода *Anaerobaculum* и *Fervidobacterium* постепенно снижали численность в ходе эксперимента при повышении нагрузки. Представители родов *Defluviitoga* и *Soehngenia* постепенно нарастали при повышении нагрузки, а группа *Clostridium III* активно развивалась в реакторе при нагрузке 8,66 кг ОВ/(м³ сутки), однако при дальнейшем повышении, постепенно снижала свою численность, при этом в самом конце эксперимента наоборот, начинала активно расти. Микроорганизмы рода *Coprothermobacter* активно увеличивали свою численность при всех нагрузках, кроме 8,66 кг ОВ/(м³ сутки) (Рисунок 21).

Во всех реакторах в планктонной форме микробного сообщества происходила смена ацетокластического типа метаногенеза на гидрогенотрофный за счет доминирования рода *Methanothermobacter* и снижения численности *Methanothrix*. В реакторе с карбоновой тканью смена сообщества происходила более резко, представители рода *Methanothrix* элиминировались практически полностью (Kamagata et al., 1992; Wasserfallen et al., 2000). Однако, при повышении нагрузки во всех реакторах в незначительных количествах начинали присутствовать представители рода *Methanosarcina*, способные в том числе к ацетокластическому метаногенезу, что может быть связано с увеличением количества ацетата при повышении нагрузки в реакторах (Kurade et al., 2019). Бактериальный компонент микробного сообщества был в основном представлен бродильными микроорганизмами. Представители рода *Anaerobaculum* сбрасывают ряд аминокислот до ацетата, пропионата и водорода, являются электрогенами и способны к синтрофному росту (Toczyłowska-Mamińska et al., 2018; Oosterkamp et al., 2019; Ao et al., 2021). Протеолитические бактерии рода *Coprothermobacter* предположительно способны к САО и участию в DIET (Lin et al., 2018; Gahlot et al., 2020). Целлюлозолитические микроорганизмы рода *Defluviitoga* являются ацетогенами, при этом имеются данные, по которым представители рода *Defluviitoga* способны к DIET совместно с археями рода *Methanothrix* (Ao et al., 2021; Yang et al., 2021). Представители кластера *Clostridium III* являются активными целлюлозолитическими микроорганизмами (Collins et al., 1994). Представители рода *Fervidobacterium* способны сбрасывать органические субстраты до ацетата и H₂ (Khan et al., 2021). Микроорганизмы рода *Soehngenia* являются сахаролитиками и слабыми протеолитиками (Parshina, Stams, 2015). Обилие протеолитических и целлюлозолитических микроорганизмов объясняется типом субстрата, который использовался в реакторе, а именно комбикормом для крупного рогатого скота К-65, богатого клетчаткой и белками.

5.2.5. Прикрепленные формы R2 и R3

Для изучения состава микробного сообщества прикреплённых форм анализировали биопленку, формирующуюся непосредственно на стекловолокне и карбоновой ткани в конце эксперимента.

Количество копий ДНК архей составило $1,1 \times 10^7$ для биопленки на стекловолокне и $2,0 \times 10^7$ для карбоновой ткани на мл пробы. Архейный состав биопленки на карбоновом войлоке и на стекловолокне был сходен, доминирующим представителем был род *Methanotherix*, однако содержание рода *Methanosarcina* было в два раза выше в биопленке на стекловолокне. Представители рода *Methanothermobacter* содержались в обеих биопленках, однако на карбоновом войлоке их численность была несколько выше (Рисунок 21). Количество копий ДНК бактерий составляло $8,7 \times 10^7$ для биопленки на стекловолокне и $1,4 \times 10^8$ для карбоновой ткани на 1 мл пробы. Основными доминирующими родами для биопленки, образовавшейся на стекловолокне, были *Anaerobaculum* и *Coprothermobacter*, а для биопленки на карбоновой ткани - *Anaerobaculum*, *Coprothermobacter* и *Defluviitoga*. В незначительных количествах содержались представители родов *Pelotomaculum* и *Clostridium III* в обеих биопленках. На биопленке на карбоновой ткани количество представителей рода *Tepidanaerobacter* было в три раза выше, а *Fervidobacterium* - в два раза, в сравнении со стекловолокном.

Микробное сообщество биопленок на карбоновой ткани и стекловолокне содержало бактерий родов *Anaerobaculum* и *Coprothermobacter*, способных к протеолитическому росту и синтрофии, как описано выше. Существенным отличием между биопленками было то, что в микробном сообществе биопленки на карбоновой ткани присутствовало большое количество микроорганизмов рода *Defluviitoga*, способных к DIET совместно с археями рода *Methanotherix*, который был доминирующим метаногеном для прикрепленных форм. Микроорганизмы рода *Tepidanaerobacter*, содержащиеся в биопленке реактора R3, способны к синтрофному окислению ацетата (Westerholm et al., 2011).

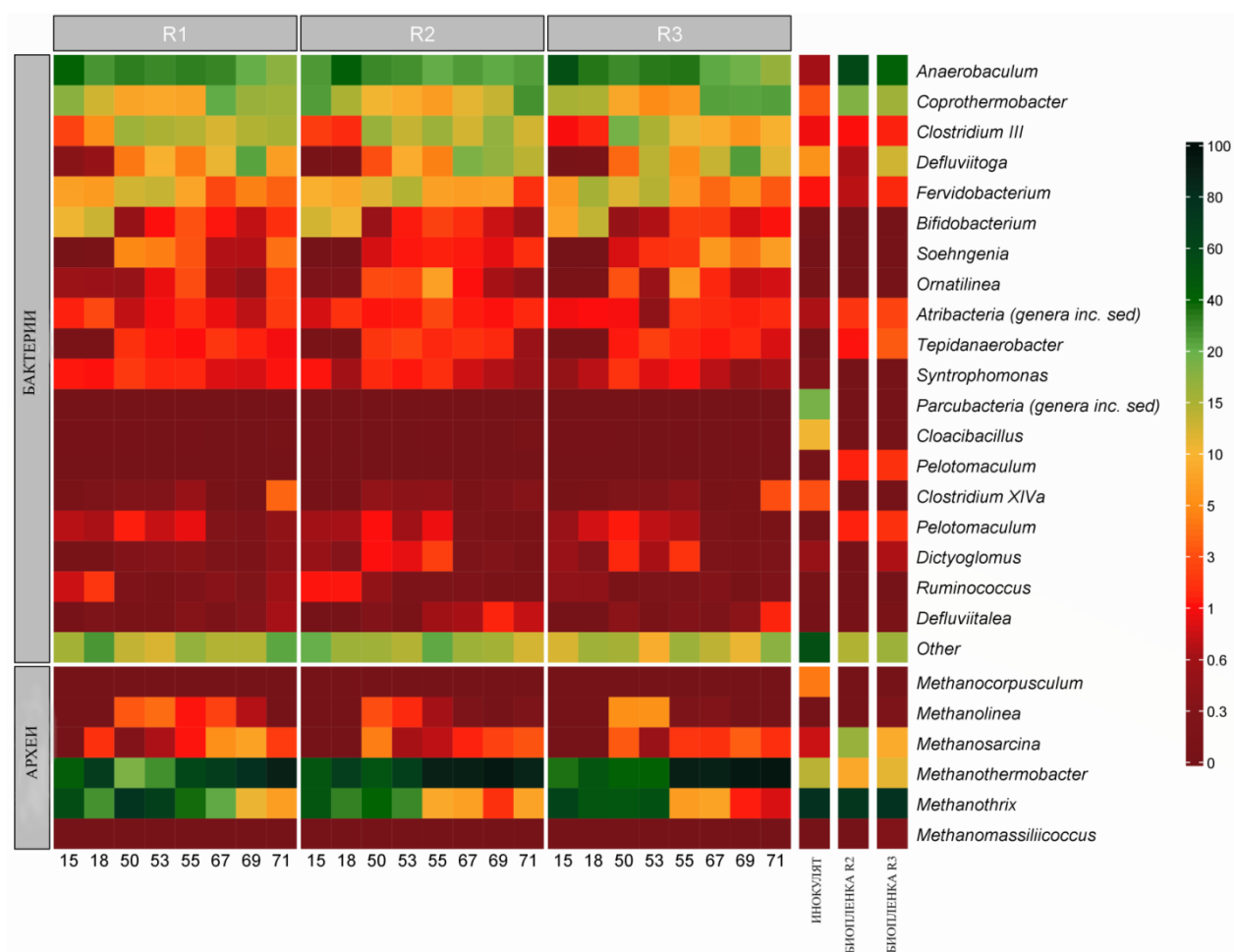


Рисунок 21. Тепловая карта динамики изменения профиля микробного сообщества на уровне родов в ходе эксперимента на основании сиквенса гена 16S рРНК для планктонных и прикрепленных форм.

В литературе описано, что при совместном сбраживании модельной ОФ-ТКО с ОСВ в мезофильном режиме при повышении нагрузки по органическому веществу до 8 кг ОВ/(м³ сутки) состав архейного компонента микробного сообщества не сильно менялся, в основном там преобладали представители рода *Methanosarcina* (Kumäläinen et al., 2012). Аналогичные результаты описаны в другой статье, где было показано, что при совместном сбраживании органической фракции твердых коммунальных отходов и ОСВ в мезофильных условиях при повышении нагрузки до 2 кг ОВ/(м³ сутки) увеличивалась метаногенная активность (за счет архей порядка *Methanosarcinales*) (Keucken et al., 2018). Согласно литературным данным, при совместном сбраживании модельных твердых бытовых отходов и твердых биологических отходов представители семейства *Methanobacteriaceae* были доминирующими гидрогенотрофными метаногенами как в мезофильных, так и в термофильных метантенках, но численность была выше при термофильном режиме (Griffin et al., 1998). В нашей работе в планктонной форме при повышении нагрузки доминировали представители рода *Methanothermobacter*, однако представители рода *Methanosarcina* присутствовали в биопленках,

причем на стекловолокне в большей степени. В литературе показано, что при совместном сбраживании ОСВ и богатых углеродом органических отходов (отходы напитков) в мезофильных условиях при повышении нагрузки по органическому веществу происходит обогащение сообщества гидролитическими и ферментативными бактериями (порядка *Clostridiales*) (Nguyen et al., 2018). В нашем эксперименте для микроорганизмов планктонной формы во всех трех реакторах наблюдалось увеличение численности группы *Clostridium III* при повышении нагрузки по органическому веществу. В работе Фитамо численность представителей родов *Coprothermobacter* и *Anaerobaculum* уменьшалась при последовательном снижении ГВУ при совместном сбраживании ОСВ, пищевых отходов, скошенной травы и садовых отходов в термофильных условиях (Fitamo et al., 2017). В нашем эксперименте численность представителей рода *Anaerobaculum* снижалась при повышении нагрузки, а численность представителей рода *Coprothermobacter* сначала снижалась, однако при максимальной нагрузке наоборот повышалась (Рисунок 21).

5.3. 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; Рисунок 22). В качестве зависимых параметров представлены OLR, ГВУ, соотношение ОФ-ТКО/ОСВ (по ОБ), выход биогаза общий, концентрация CH_4 в реакторном биогазе, выход CH_4 общий, удаление ОБ, рН, электропроводность, содержание этанола, ацетата, пропионата, н- и изо-бутирата, н- и изо-валерата, общее содержание ЛЖК и микробный состав планктонных форм сообщества.

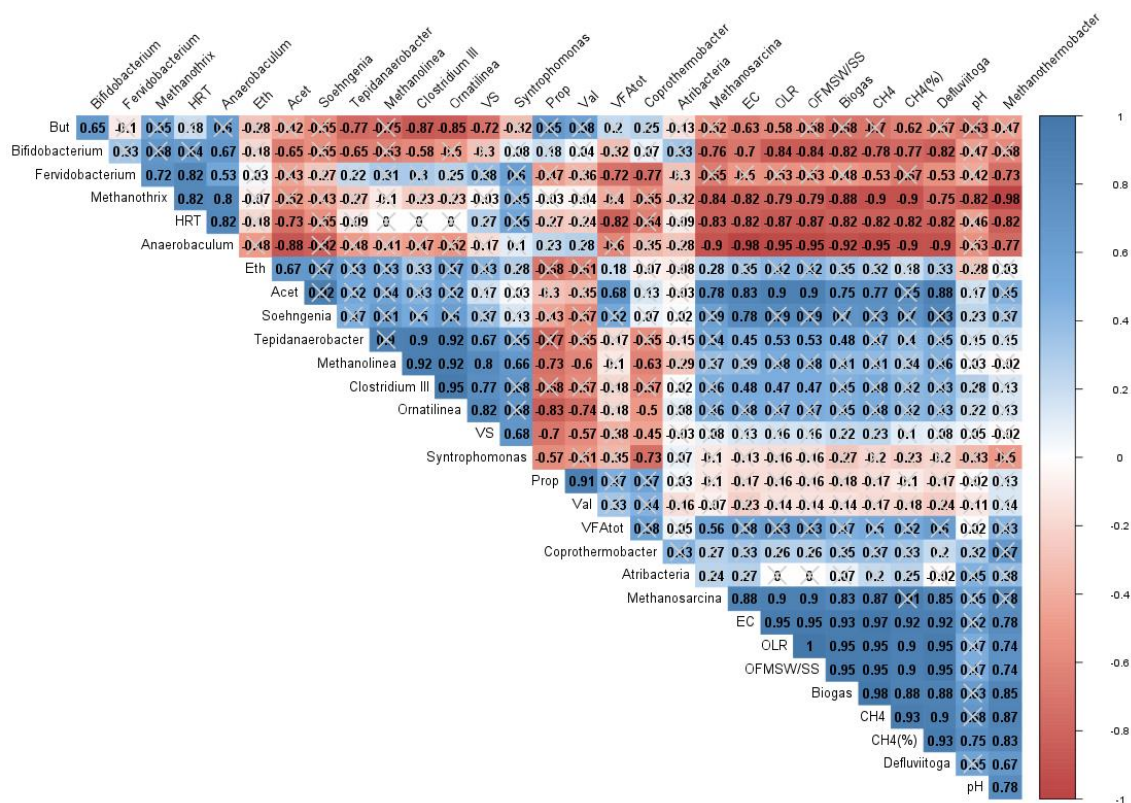


Рисунок 22. Корреляция между характеристиками процесса АС и микробным составом планктонных форм. Различия считались достоверными при $p < 0,05$, где не статистически значимые отличия значения отмечены серым крестиком. Обозначения: OLR – нагрузка по органическому веществу, HRT – гидравлическое время удержания, OFMSW/SS – соотношение ОФ-ТКО/ОСВ (по ОБ), Biogas – выход биогаза общий, CH₄% - концентрация CH₄ в реакторном биогазе, CH₄ – выход CH₄ общий, VS – удаление ОБ, pH, EC – электропроводность, Eth – содержание этанола, Acet – ацетата, Prop – пропионата, But – n- и изо-бутирата, Val – n- и изо-валерата, VFAtot – ЛЖК общее содержание.

Содержание родов *Bifidobacterium*, *Fervidobacterium* и *Anaerobaculum* негативно коррелировали с повышением OLR и показали достоверную ($p < 0,05$) отрицательную корреляцию с основными параметрами АС, такими как выход биогаза и метана, содержание метана в биогазе. Согласно литературным данным, микроорганизмы рода *Fervidobacterium* снижали численность при увеличении OLR. Численность представителей рода *Anaerobaculum* уменьшалась при последовательном снижении ГВУ при совместном сбраживании ОСВ, пищевых отходов, скошенной травы и садовых отходов в термофильных условиях (Fitamo et al., 2017). Напротив, микроорганизмы родов *Defluviitoga*, *Methanothermobacter* и *Methanosarcina* повышали численность при высоком OLR, и численность была статистически значимо связана с высоким выходом метана. Планктонные микроорганизмы рода *Defluviitoga* положительно и статистически значимо коррелируют с микроорганизмами родов *Methanothermobacter*,

Methanosarcina, а с *Methanothrix* отрицательно, что может быть связано с разным оптимальным уровнем нагрузки в реакторах для этих групп (Griffin et al., 1998; Keucken et al., 2018). Численность микроорганизмов рода *Methanothrix* статистически значимо положительно коррелировала с ГВУ и негативно с OLR и основными параметрами АС, такими как выход биогаза и метана и содержание метана в биогазе, а также микроорганизмами рода *Methanothermobacter*. Представители группы *Clostridium III* положительно и статистически значимо коррелируют с OLR и соотношением ОФ-ТКО/ОСВ, что соответствует литературным данным. В литературе показано, что при совместном сбраживании ОСВ и богатых углеродом отходов (отходы напитков) в мезофильных условиях при повышении нагрузки по органическому веществу происходит обогащение сообщества гидролитическими и ферментативными бактериями (порядок *Clostridiales*) (Nguyen et al., 2018).

Основные результаты и выводы по Главе 5.

Сопоставление комплекса статистически значимых биотехнологических и микробиологических параметров показало, что добавление карбоновой ткани положительно сказывается на процессе анаэробного сбраживания, особенно при высоких нагрузках по органическому веществу (12,12 кг ОВ/(м³ сутки)). Добавление карбоновой ткани способствовало удержанию микроорганизмов в реакторе и формированию биопленки лучше, чем стекловолокно. Биопленка на карбоновой ткани была богата микроорганизмами рода *Deffluviitoga*, способными к DIET, что объясняет улучшение характеристик АС для реактора R3 в сравнении с остальными. Для реакторов показана корреляция между микробными представителями планктонных форм и биотехнологическими параметрами, в частности повышение OLR положительно коррелирует с численностью представителей родов *Deffluviitoga*, *Methanothermobacter*, *Methanosarcina* и группы *Clostridium III*, и отрицательно с родами *Anaerobaculum* и *Methanothrix*. Изучение корреляций между биотехнологическими параметрами и микробным сообществом позволяет предсказать и стабилизировать процесс анаэробного сбраживания, а также сделать технологию более эффективной.

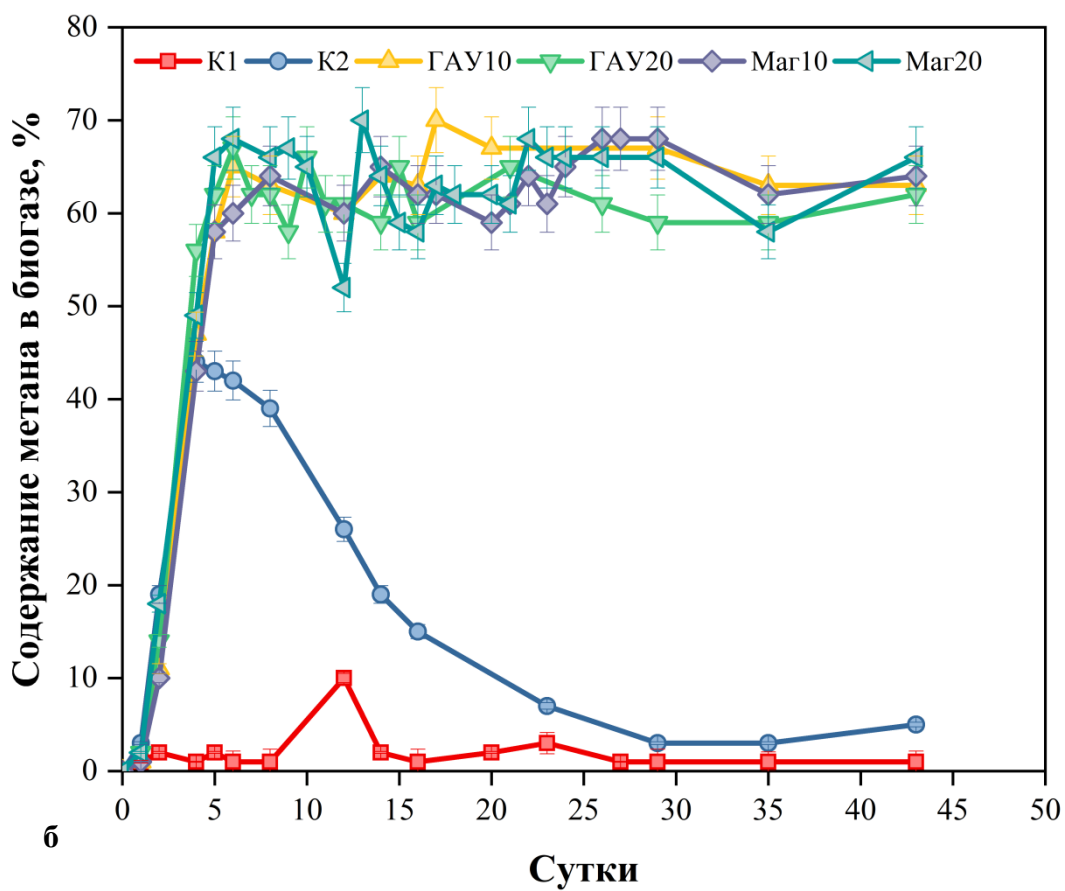
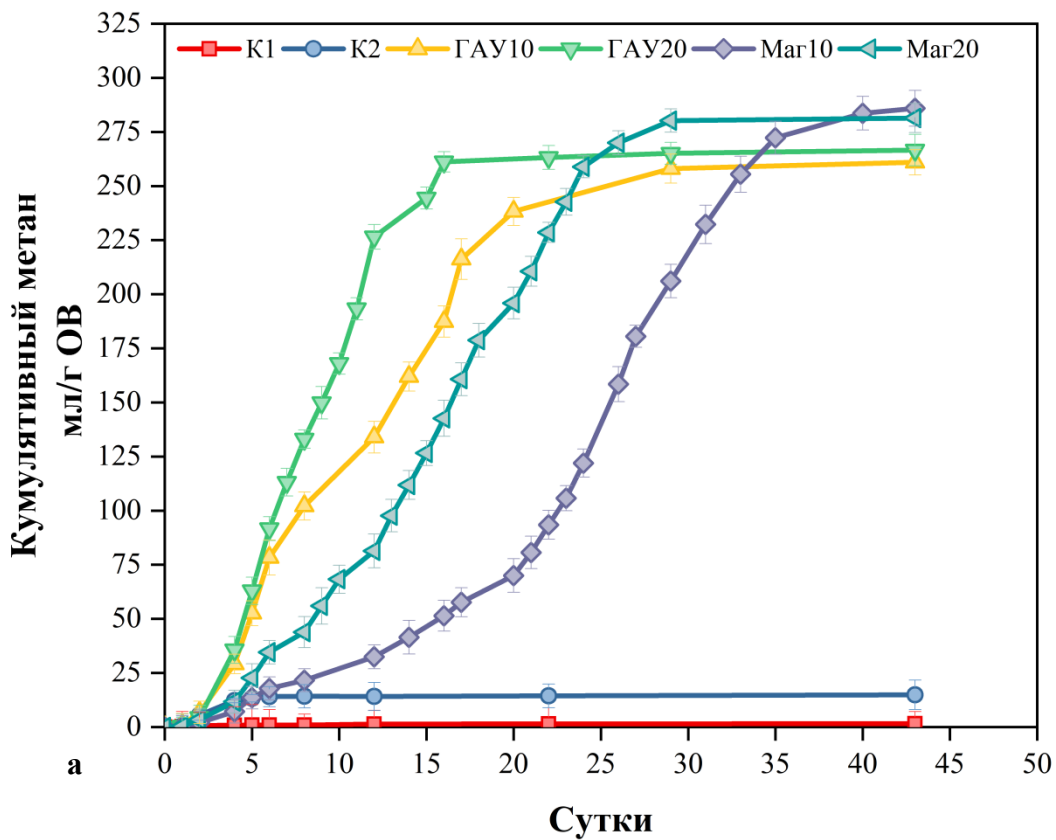
Глава 6. Влияние разных количеств электропроводящего материала - гранулированного активированного угля (ГАУ) и магнетита на скорость разложения ЛЖК и метанообразования при твердофазном анаэробном сбраживании (Эксперимент 3).

В данном разделе исследовали влияние разных количеств электропроводящих материалов на процесс ТФ АС органической фракции твердых коммунальных отходов. Для улучшения процесса ТФ АС, была использована оригинальная стратегия пространственного разделения фракций электропроводящего материала и сбраживаемого субстрата внутри реактора. Это способствовало разделению процессов гидролиза/ацидогенеза и ацетогенеза/метаногенеза в едином объеме реактора.

6.1. Характеристика анаэробного сбраживания

6.1.1. Образование метана, кинетические параметры метаногенеза

Внесение электропроводящих материалов существенно улучшило характеристики твердофазного анаэробного сбраживания модельной ОФ-ТКО. Наибольший выход метана наблюдался во флаконах с добавлением 20 г ГАУ и составил 11,75 л (или 267 мл $\text{CH}_4/\text{г ОВ}$), и во флаконах с 10 г магнетита – 12,6 л метана (или 286 мл $\text{CH}_4/\text{г ОВ}$) (Рисунок 23). Чуть ниже выход метана был при добавлении ГАУ и магнетита в количестве 10 и 20 г и составил 11,5 и 12,4 л (или 261 и 281 мл $\text{CH}_4/\text{г ОВ}$). 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 $\text{CH}_4/\text{г ОВ}$, а в К1 - всего 1,59 мл $\text{CH}_4/\text{г ОВ}$. Содержание метана в биогазе флаконов, содержащих слой электропроводящего материала, после 5-х суток эксперимента составляло в среднем 63,1%, 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 1,48%. Процессы гидролиза и кислотогенеза в первые 4-7 суток сопровождалось накоплением значительного количества водорода, суммарный объем был наибольшим во флаконе К1 и составил 21,98 мл $\text{H}_2/\text{г ОВ}$. В остальных флаконах накопление водорода прекратилось уже на 4 сутки, общий объем накопленного водорода составил $9,08 \pm 1,98$ мл $\text{H}_2/\text{г ОВ}$ (Рисунок 23).



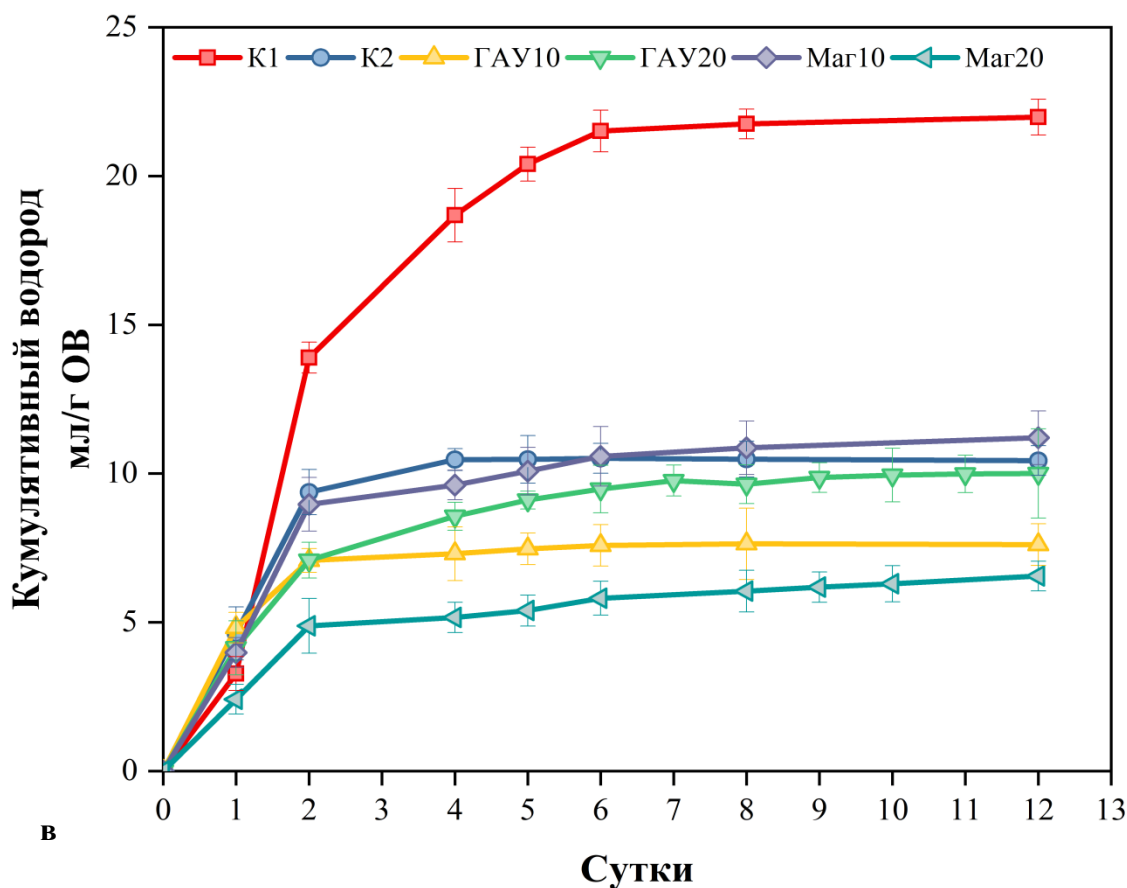


Рисунок 23. Динамика образования метана (а), содержания метана в биогазе (б) и водорода (в) при твердофазном АС ОФ-ТКО.

Кинетические параметры метаногенеза были получены с помощью уравнения Гомперца (Таблица 17). Самый высокий потенциальный выход метана (γ) был у флаконов ГАУ20 и Маг10, и составил 270 и 350 мл $\text{CH}_4/\text{г ОВ}$. Интересно отметить, что для проб с магнетитом, потенциальный выход метана был существенно выше, чем для проб с ГАУ (Таблица 17). Максимальная скорость выхода метана (К) была самой высокой для ГАУ20 и Маг20 и составила 26,38 и 15,28 мл $\text{CH}_4/(\text{г ОВ} \text{ сутки})$. Самая короткая лаг-фаза (λ) была характерна для проб ГАУ10 и Маг20 и составила 2,09 и 6,12 суток. Интересно, что λ для флаконов с магнетитом была существенно длиннее, в сравнении с флаконами с добавлением угля. Кинетические параметры γ , К и λ для контролей К1 и К2 были существенно ниже, чем во флаконах с добавлением электропроводящих материалов, что объясняется быстрым прекращением метаногенеза и остановкой процесса. R^2 для всех проб, исключая К1, где метаногенез быстро завершился, был $\geq 0,99$, что говорит о высокой достоверности полученных расчетов. График RDA показывает связь материалов с кинетическими параметрами процесса твердофазного анаэробного сбраживания модельной ОФ-ТКО; RDA1 составляет 90,5%, а RDA2 – 9,5% от общей дисперсии (Рисунок 24). Кинетические параметры К и γ имели положительную

корреляцию с пробами ГАУ10 и ГАУ20, а λ , $T_{90\%}$ и $T_{эфф}$ положительно коррелировали с флаконами с магнетитом, особенно с Маг 20.

Таблица 17. Кинетические параметры процесса твердофазного анаэробного сбраживания модельной ОФ-ТКО.

Параметр	Единица измерения	K1	K2	ГАУ10	ГАУ20	Маг10	Маг20
Модифицированная модель Гомперца							
γ	мл $\text{CH}_4/\text{г ОВ}$	1,50	14,34	266,75	270,07	350,12	309,12
K	мл $\text{CH}_4/(\text{г ОВ сутки})$	0,14	5,12	15,32	26,38	13,14	15,28
λ	сутки	0,50	0,98	2,09	2,83	13,78	6,12
$T_{90\%}$	сутки	10,33	4,33	15,07	22,90	45,64	30,30
$T_{эфф}$	сутки	9,83	3,35	12,98	20,07	31,86	24,18
R^2	-	0,92	1,00	0,99	1,00	0,99	0,99

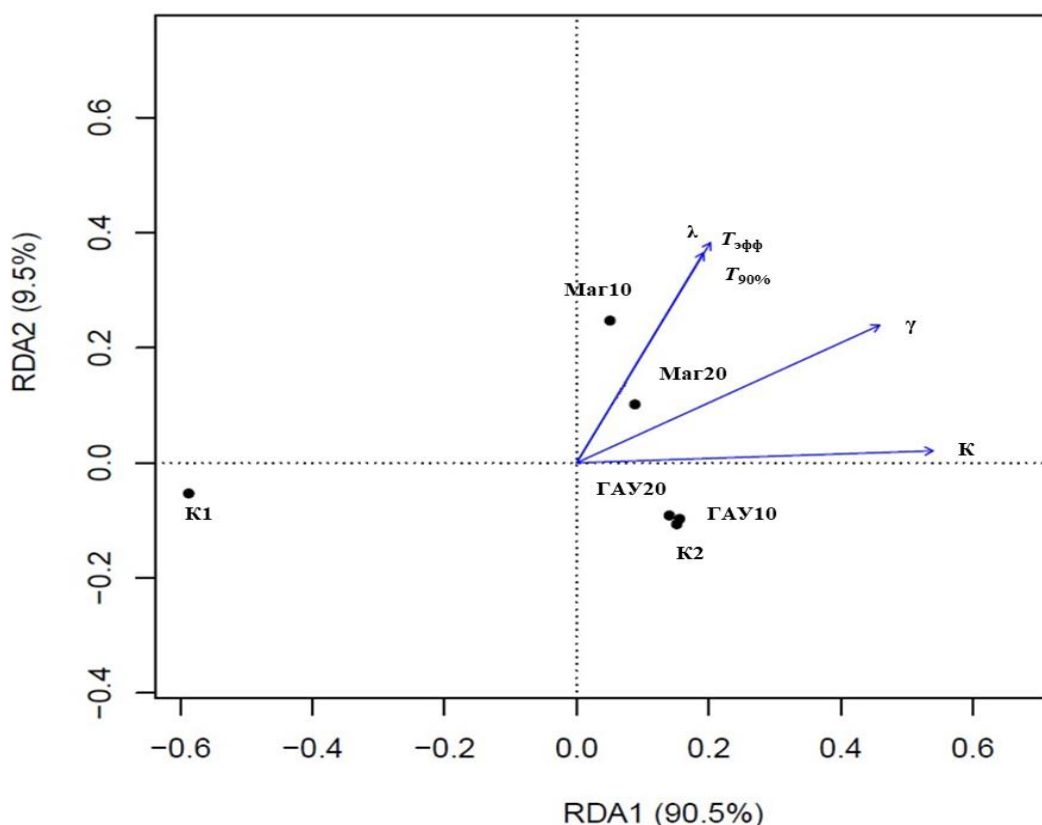


Рисунок 24. Анализ избыточности (RDA), показывающий взаимосвязь между внесенными материалами и кинетическими параметрами АС. K , λ , $T_{90\%}$, $T_{эфф}$, γ – основные кинетические параметры АС.

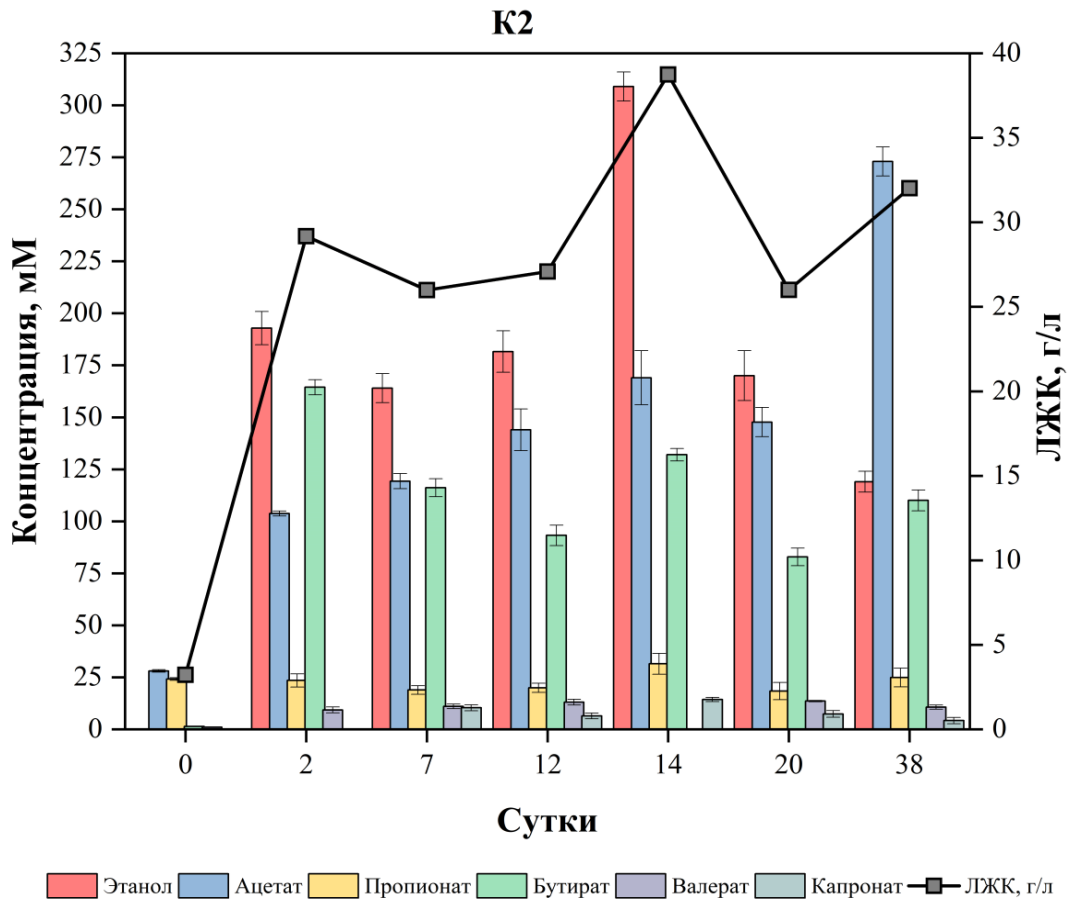
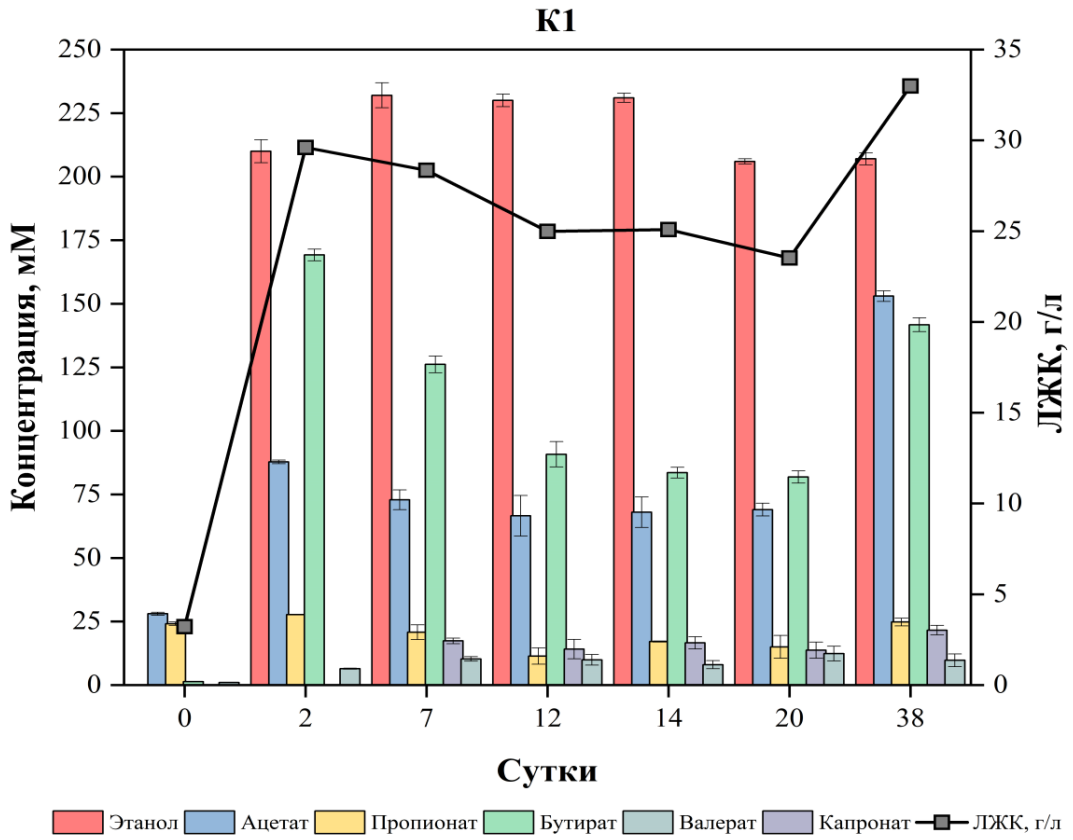
Согласно Ху с соавторами, при внесении пудры активированного угля в концентрации 10 и 20 г/л при твердофазном АС кухонных отходов продукция метана была равна 86,53 и 231,50 мл $\text{CH}_4/\text{г ОВ}$ (Hu et al., 2023), что согласуется с нашими данными для ГАУ20, но не для ГАУ10. Наблюдаемая разница, возможно, объясняется разным способом внесения кондуктивных материалов в реактор. В работе Сан с соавторами утверждается, что внесение активированного угля улучшает твердофазное анаэробное сбраживание ОСВ. Так, выход метана на ранней стадии АС вырос на 124,0–146,3%, но дозировка активированного угля в диапазоне 2–12 г/л имела слабый эффект (Sun et al., 2020). В нашем эксперименте различие в выходах метана между флаконами ГАУ10 и ГАУ20 составило всего 2,13%, в то же время результаты между парами ГАУ и Маг более значительные. Сан с соавторами также отметили, что добавление диатомита в концентрации 2 г/л не оказало существенного влияния на выход метана (1%) в сравнении с контролем (Sun et al., 2020). Однако в нашем эксперименте различия были более существенные – суммарный выход метана в контроле с добавлением диатомита был равен 0,655 л, а без – 0,07 л, что объясняется частичной ролью диатомита как адсорбирующего агента и защиты микроорганизмов от агрессивной среды. Вэнг с соавторами отметили, что внесение магнетита в концентрации 50 мг/г СВ положительно влияло на твердофазное АС ОСВ, K составила 27,80 мл $\text{CH}_4/(\text{г ОВ сутки})$, а λ составила 2,20 суток (Wang et al., 2018). Эти результаты сравнимы с ГАУ20, который показал наилучшие результаты по кинетике образования метана. В то же время при внесении 10 и 20 г магнетита λ и K существенно отличались, λ была длиннее, а K меньше (Таблица 17).

6.1.2. Динамика образования и потребления ЛЖК, удаления органического вещества, pH

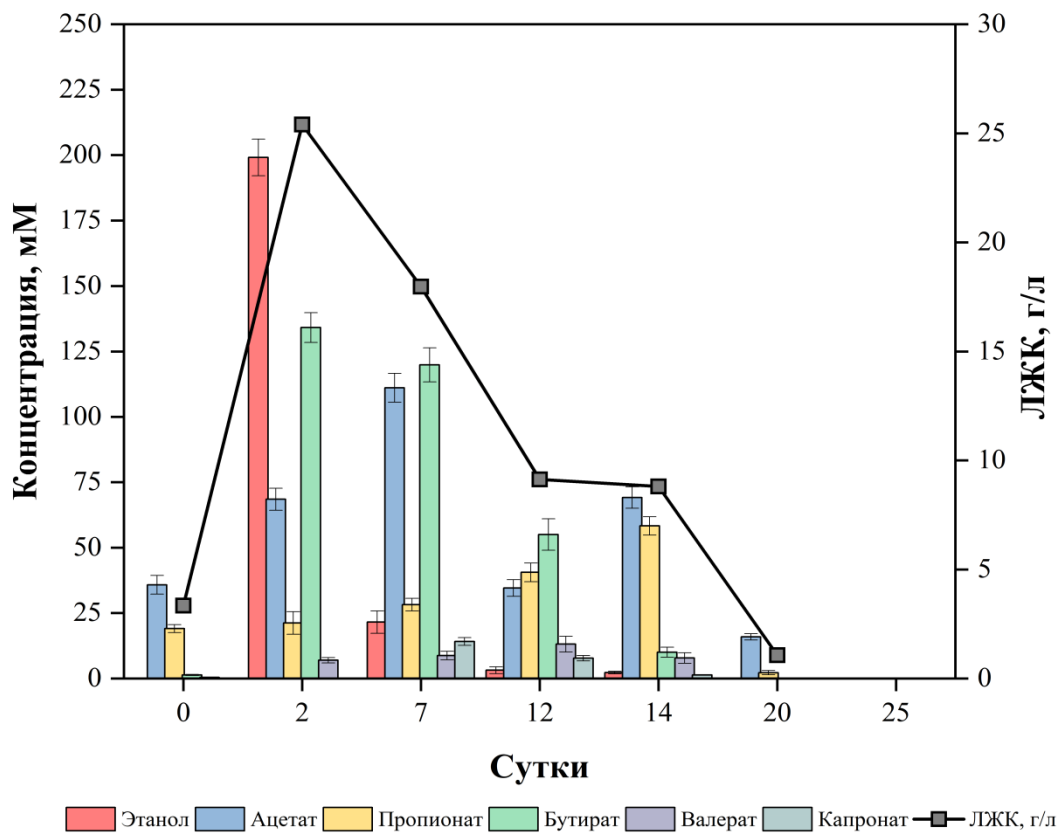
Динамика накопления и потребления ЛЖК в процессе твердофазного АС модельной ОФ-ТКО отличалась в зависимости от концентрации и природы электропроводящего материала. Во флаконах с добавлением ГАУ в количестве 10 и 20 г максимальная концентрация ЛЖК достигала 25,40 и 25,35 г/л на 2 сутки и снижалась к 20 суткам эксперимента. Во флаконах с магнетитом детектировались различия по сравнению с флаконами серии ГАУ. В Маг10 и 20 максимальная концентрация ЛЖК наблюдалась на 2 сутки и достигала 28,38 и 28,8 г/л, но практически полное разложение ЛЖК происходило к 38 суткам для Маг10 и к 20 суткам для Маг20 (Рисунок 25). 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 32,99 г/л, незначительное снижение концентрации ЛЖК наблюдали на 7 сутки. В К2 отмечалась аналогичная картина: ЛЖК постепенно накапливались, достигая концентрации 32,02 г/л на 38 сутки, небольшое снижение регистрировали на 7 сутки, вероятно за счет потребления этанола (Рисунок 25). Эффект от добавления электропроводящих

материалов заметен 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%. рН на 20 сутки для флаконов с внесёнными электропроводящими материалами был 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. За счет солюбилизации твердых частиц и удаления значительной части ОВ в виде биогаза, влажность сброженной массы для флаконов с магнетитом в конце эксперимента составила $88,4 \pm 0,28$, для флаконов с ГАУ – $88,95 \pm 1,2$, а для контролей – $83,75 \pm 0,35$.

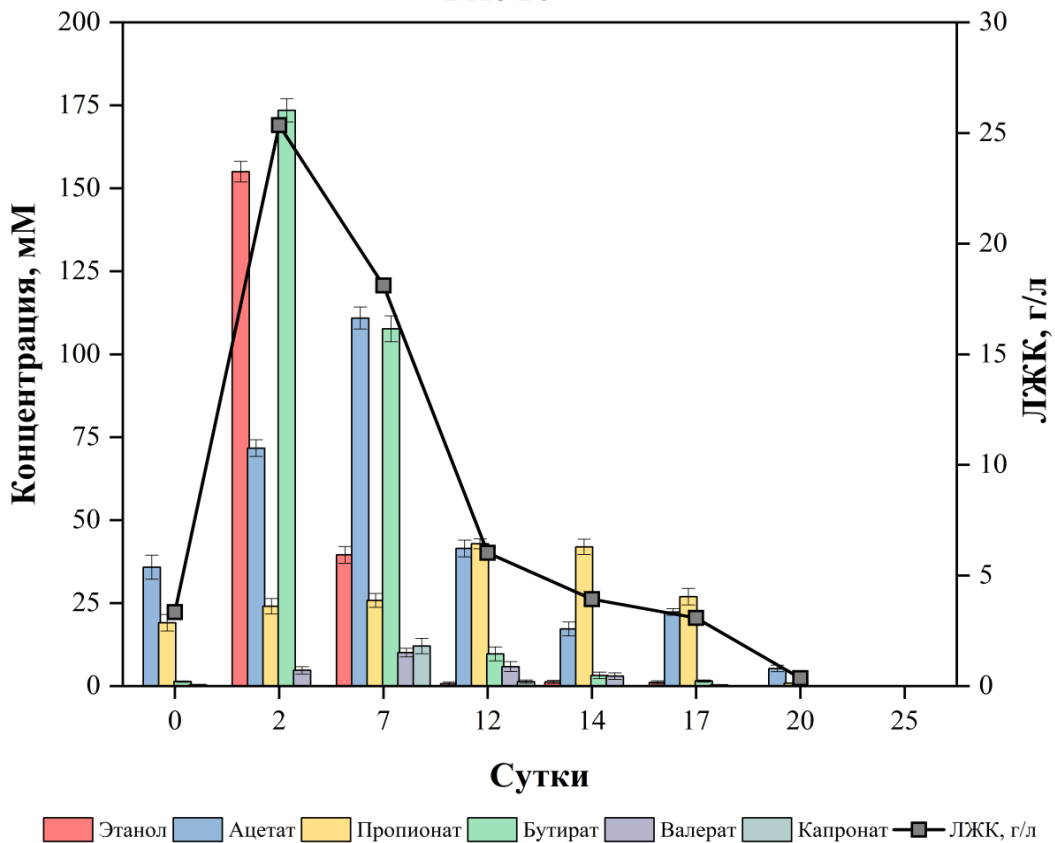
В литературе отмечено, что добавление пудры активированного угля при твердофазном АС кухонных отходов в концентрации 10 и 20 г/л показывало степень удаления ОВ порядка 38-40%, что согласуется с нашими экспериментальными данными, а конечный рН был равен 5,28 и 6,33, что было значительно ниже, чем в нашем эксперименте. Такое различие, вероятно, может быть связано с разными адсорбционными свойствами и площадью поверхности ГАУ и пудры активированного угля (Hu et al., 2023). В то же время в литературе показаны преимущества пудры активированного угля перед ГАУ за счет значительно большей площади поверхности на единицу массы и лучшей абсорбции мелких коллоидных частиц и высокомолекулярных органических соединений на поверхности (Hu, Stuckey, 2007). В работе Сан с соавторами показано, что при твердофазном анаэробном сбраживании ОСВ дозировка активированного угля в диапазоне 2-12 г/л имеет незначительный эффект, а рН к концу эксперимента был в диапазоне 7,1 – 7,8, что согласуется с нашими данными. Активный ил имеет высокое содержание азота, что могло быть причиной высокого рН вследствие высвобождения аммиака, однако, как и в данной работе, динамику концентрации аммонийного азота не отслеживали (Sun et al., 2020). Вэнг с соавторами отметили, что при внесении магнетита в концентрации 50 мг/г СВ при твердофазном анаэробном сбраживании ОСВ, концентрация короткоцепочечных жирных кислот была $13494,3 \pm 272,7$ мг ХПК/л на 4 сутки, однако самая высокая концентрация короткоцепочечных жирных кислот была на 2 день эксперимента, аналогично нашим данным (Wang et al., 2018). Вероятно, различие в скоростях разложения ЛЖК во флаконах Маг10 и Маг20 может быть связано с различными рН, а именно 6,17 и 7,12 на 20 сутки эксперимента. В отличие от ГАУ, магнетит не обладает столь же высокой адсорбирующей активностью. Известно, что идеальный диапазон рН для анаэробного сбраживания очень узок: рН 6,8–7,2, а скорость роста метаногенов значительно снижается при рН ниже 6,6 (Ward et al., 2008). В К1 и К2 рН был слишком низким для АС (4,0 и 5,1), что объясняет значительное ингибирование метаногенеза.



ГАУ10



ГАУ20



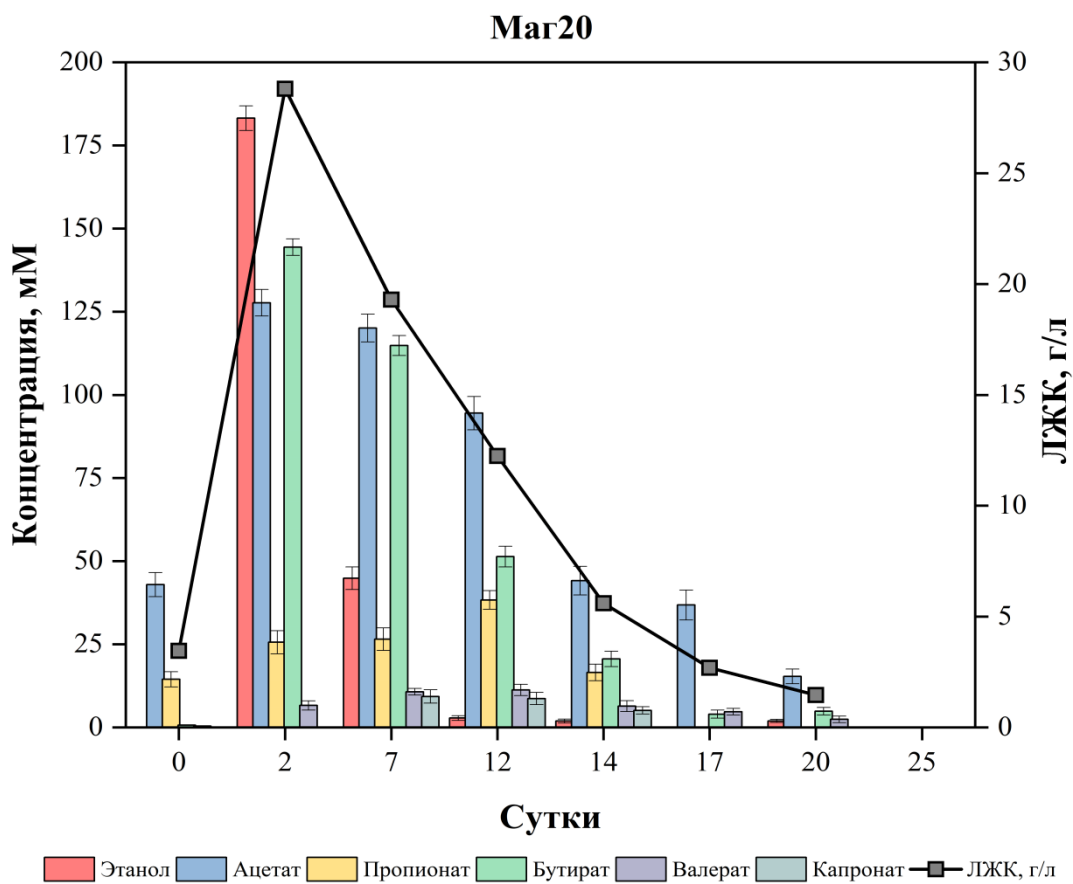
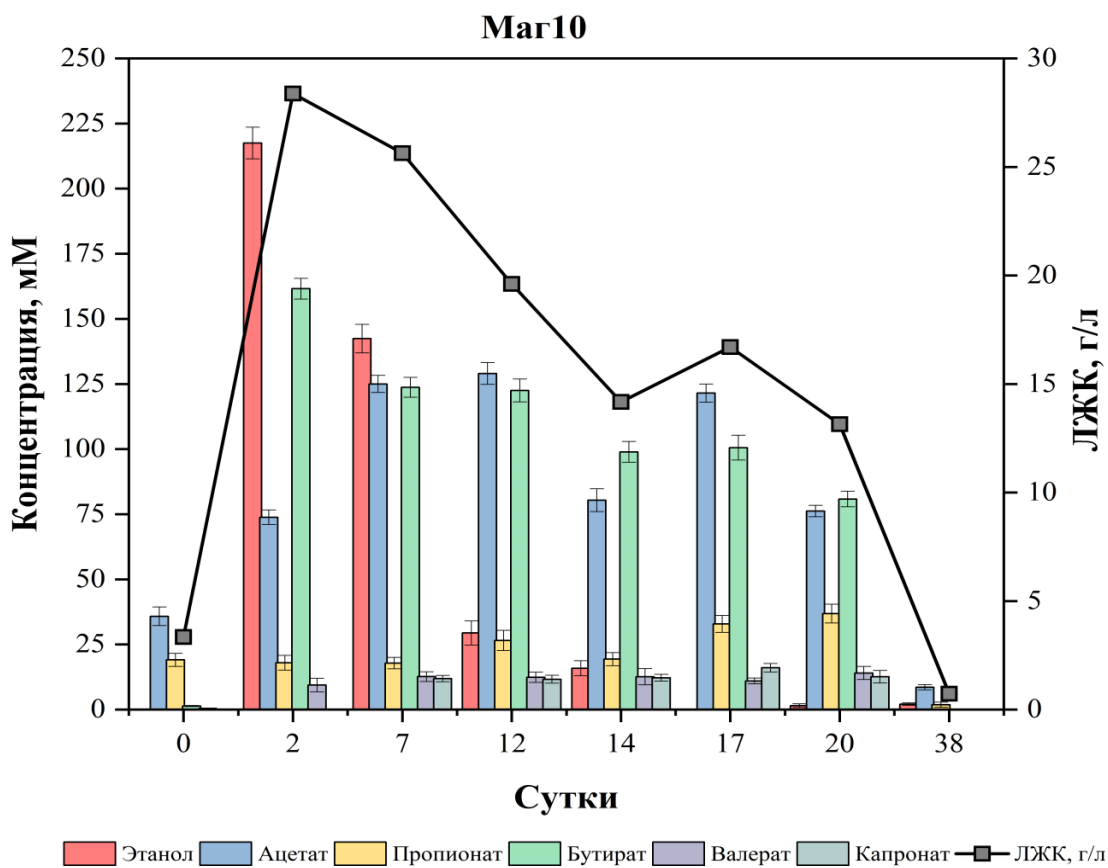


Рисунок 25. Динамика образования и потребления ЛЖК при твердофазном анаэробном сбраживании ОФ-ТКО.

6.2. Особенности морфологии биопленок на поверхности материалов (СЭМ)

Анализ микробного биообрастания на трех разных поверхностях: диатомите (Рисунок 26 а1-2), ГАУ (Рисунок 26 б1-3) и магнетите (Рисунок 26 в1-2), проводили по изображениям, полученным с помощью СЭМ. В работе оценивали структуру и плотность биопленок, клеточный состав, наличие и вид пилеподобных структур, которые могут дать представление о различных типах DIET в этой системе. 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 26 а1). В углублениях на поверхности диатомита встречались более крупные скопления – до 10 мкм толщиной. В биопленке на диатомите было отмечено самое высокое морфологическое разнообразие клеток: вытянутые тонкие палочки длиной более 40 мкм-и округлые клетки диаметром меньше 1 мкм (Рисунок 26 а2, показаны черными стрелками). Клетки хорошо просматривались сквозь матрикс. На гладкой, пористой поверхности ГАУ наблюдалось незначительное биообрастание (Рисунок 26 б1), основная часть биопленки скапливалась в углублениях и трещинах (Рисунок 26 б2). Биопленка на ГАУ была представлена скоплениями небольших округлых конгломератов диаметром 5-10 мкм с включенными клетками (Рисунок 26 б1) или сетчатой или нитеобразной структурой, опутывающей углубления на поверхности минерала (Рисунок 26 б2). В биопленке встречались клетки разной морфологии: палочковидные формы с диаметром от 0,3 до 5 мкм и длиной от 2 до 60 мкм; кокковые формы с диаметром от 0,5 мкм до 10 мкм. Присутствовали грибные споры (Рисунок 26 б2, показаны черными стрелками). Биообрастание на магнетите было самым интенсивным (Рисунок 26 в1). На поверхности магнетита наблюдался плотный слой биопленки толщиной до 10-15 мкм, напоминающий хлопьевидную пенообразную массу. Клетки были глубоко погружены в матрикс, что создает трудности в определении их морфологии (Рисунок 26 в2). В биопленке обнаруживались в основном мелкие клетки (1-2 мкм) округлой формы, поверхность которых почти полностью покрывал матрикс (Рисунок 26 в2, черные стрелки). В составе биопленок на всех трех материалах были обнаружены пилеподобные структуры, соединяющие клетки друг с другом или с материалом. Больше всего пилеподобных структур наблюдали в биопленке на ГАУ, представленных тонкими ровными нитями диаметром 5-10 нм и длиной до 20 мкм (Рисунок 26 б2, указаны белыми стрелками). В биопленках на магнетите были замечены пилеподобные структуры другого типа, более толстые (10-20 нм) и короткие (до 5 мкм) с узловатой структурой. Пилеподобные структуры в биопленках на магнетите появлялись в местах со слабым биообрастанием и соединяли клетки в

матрице с поверхностью минерала (Рисунок 26 в2, указаны белыми стрелками). На диатомите обнаруживались оба типа пилеподобных структур: и длинные, и короткие (Рисунок 26 а2).

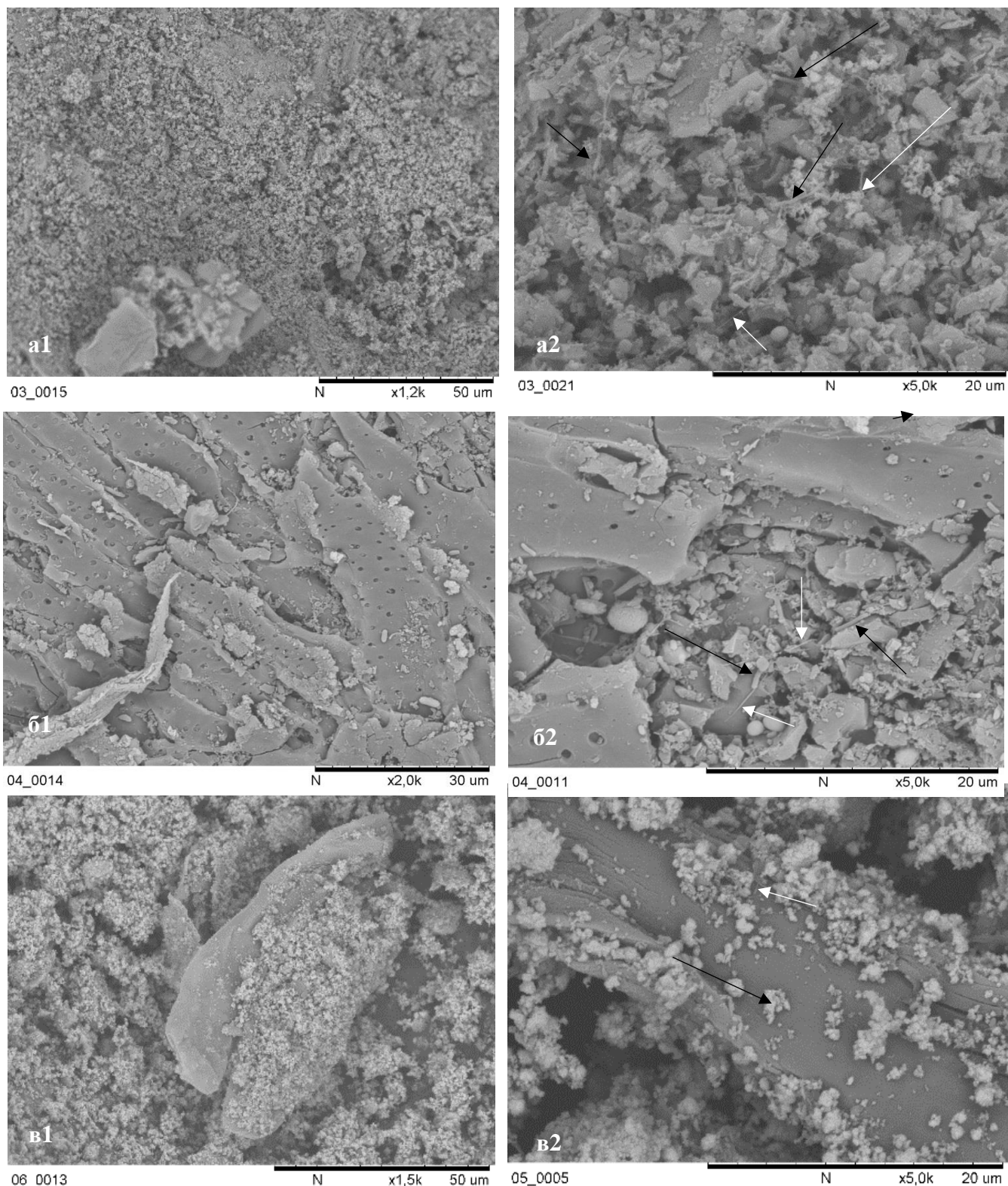


Рисунок 26. СЭМ изображения биопленок, полученных на разных материалах: а1-2 – диатомит; б1-2 – ГАУ; в1-2 – магнетит. Изображения получены с помощью ТМ-3000 сканирующего микроскопа с разным увеличением, указанным внизу фотографий. Черными стрелками указаны микробные клетки. Белыми стрелками указаны пилеподобные структуры.

В работе Флорентино с соавторами при АС хоз-фекального стока (моча и фекалии) в биопленках на ГАУ были обнаружены пилеподобные структуры, по форме и размерам аналогичные пилеподобным структурам на ГАУ в нашем эксперименте (Florentino, et al., 2019). В работе Горби с соавторами были описаны пилеподобные нити с высокой электропроводностью *Pelotomaculum thermopropionicum* в кокультурах с *Methanothermobacter thermoautotrophicus*, сходные с пилеподобными структурами на магнетите в нашем эксперименте (Gorby et al., 2006). В работе Вэнга с соавторами показано, что магнетит уменьшал потребность в пилях, что, вероятно объясняет небольшое количество пилеподобных структур в пробах Маг10 и 20 (Wang et al., 2018). Наличие пилеподобных структур дает основание предполагать, что в этих биопленках мог протекать DIET через е-пили, помимо DIET с ЭМ или плотным контактом клеток с участием цитохромов *c*-типа.

6.3. 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). Анализировались инокуляты (Ин), в конце эксперимента отбирались пробы из надосадочной жидкости (Жид), анализировались микроорганизмы, обрастающие диатомит (Диат) и микроорганизмы, находящиеся на электропроводящем материале (ГАУ/Маг). Индексы разнообразия рассчитывали по ОТЕ, полученным после секвенирования 16S рНК в базе данных SILVAngs (Таблица 18). Индексы Симпсона и Шеннона характеризуют разнообразие микробного сообщества, индекс Чао 1 характеризует богатство микробного сообщества (Roswell et al., 2021). Индекс Чао 1 был самым высоким для К в сравнении с остальными пробами после эксперимента, что говорит о высоком богатстве микроорганизмов в контрольном образце. Однако, во флаконах с магнетитом и ГАУ во всех фракциях были более высокие значения индекса Шеннона, что говорит о большей разнообразии микроорганизмов (Guan et al., 2023). Согласно Сан с соавторами, добавление активированного угля при твердофазном АС ОСВ увеличивает видовое разнообразие микроорганизмов, в частности, значение индекса Шеннона; в нашем эксперименте добавление ГАУ аналогично повышало значение индекса Шеннона в сравнении с контролем и инокулятом (Sun et al., 2020). Внесение магнетита повышало значение индекса Шеннона во всех фракциях по сравнению с К, но было ниже в сравнении с ИнМаг. В статье Фэнг с соавторами показано, что внесение магнетита в концентрации 20 г/л при АС фурфурола снижало значение индекса Шеннона в сравнении с концентрациями магнетита 10 и 5 г/л, но бактериальное разнообразие было выше, чем у контроля (Feng et al., 2022). В литературе показано снижение ОТЕ и индексов Шеннона, Чао 1 в реакторных пробах в сравнении с инокулятом при анаэробном сбраживании сырого глицерина с добавлением Fe₃O₄, покрытого цитратом, аналогично нашим результатам, что, вероятно,

указывает на влияние электропроводящего материала на селекцию микроорганизмов (Boscaro et al., 2022).

Таблица 18. Индексы разнообразия (среднее значение \pm стандартное отклонение) для инокулята, взвешенных и прикрепленных микробных сообществ.

Обозначения: ИнК – инокулят, использованный для К, ИнГАУ – инокулят использованный для ГАУ, ИнМаг – инокулят, использованный для Маг, К – жидкая фракция К, ГАУ – биопленки на ГАУ, Маг – биопленки на магнетите, ДиатГАУ – биопленки на диатомите для флакона ГАУ, ДиатМаг – биопленки на диатомите для флакона с магнетитом, ЖидГАУ – жидкая фракция во флаконе с ГАУ, ЖидМаг – жидкая фракция во флаконе с магнетитом.

Индекс	ИнК	ИнГАУ	ИнМаг	К	ГАУ	ДиатГ	ЖидГ	Маг	ДиатМ	ЖидМ
ОТЕ	269,5 \pm 4, 950	275,5 \pm 3 0,406	281,50 \pm 36,062	190,00 \pm 18 ,385	115 \pm 9,8 99	130 \pm 1,4 14	108,50 \pm 3,536	108 \pm 9,8 99	121,5 \pm 7, 778	82,5 \pm 7,7 78
Симпсон	0,92 \pm 0,0 06	0,50 \pm 0,6 02	0,93 \pm 0,0 05	0,80 \pm 0,00 7	0,90 \pm 0,0 01	0,90 \pm 0,0 02	0,87 \pm 0,0 02	0,89 \pm 0,0 00	0,88 \pm 0,0 00 \ddot{e}	0,86 \pm 0,0 01
Шеннон	3,75 \pm 0,0 55	2,28 \pm 1,9 13	3,67 \pm 0,0 04	2,42 \pm 0,02 1	2,87 \pm 0,0 06	2,87 \pm 0,0 14	2,62 \pm 0,0 11	2,77 \pm 0,0 21	2,75 \pm 0,0 13	2,48 \pm 0,0 02
Чао 1	403,15 \pm 34,72	420,15 \pm 82,66	428,00 \pm 92,49	286,70 \pm 22 ,49	150,40 \pm 18,67	243,70 \pm 17,82	188,60 \pm 6,36	138,10 \pm 19,66	164,10 \pm 17,39	104,56 \pm 9 ,11

6.3.1. Контроль

Основными доминирующими археями в инокуляте К (ИнК) были члены родов *Methanothermobacter*, *Candidatus Methanoplasma*, значительно меньше было представителей родов *Methanobrevibacter*, *Methanoculleus* и *Bathyarchaeia* (Рисунок 27 а). Бактериальный компонент сообщества инокулята был разнообразным, основной доминирующей группой были *Clostridium MBA03*, в меньшем количестве содержались *Lentimicrobiaceae* и *Syntrophomonas* (Рисунок 28 а). В ходе эксперимента микробное сообщество К значительно менялось. Снижалась численность архей, доминирующим родом становился *Candidatus Methanoplasma*, количество архей *Methanothermobacter*, *Methanoculleus*, *Methanobrevibacter*, *Methanocorpusculum* и *Methanomassiliicoccus* существенно снижалось, но повышалась численность *Methanosarcina*. В бактериальном компоненте сообщества произошли значительные изменения в ходе эксперимента, доминирующим родом стал *Caproiciproducens*, увеличилась численность представителей *Clostridium sensu stricto 7*, *Romboutsia*, *Turicibacter*, *Defluviitoga* и *Clostridium sensu stricto 1*.

Исходя из экспериментальных данных, метаногенез в контроле ингибировался, что объясняется постепенной элиминацией архей, снижением гидрогенотрофных представителей

родов *Methanothermobacter*, *Methanobrevibacter*, *Methanocorpusculum*, метилотрофных *Candidatus Methanoplasma*, *Methanomassiliicoccus* и повышению численности ацетокластических *Methanosarcina*, что связано с высокой чувствительностью метаногенных архей к среде с высоким уровнем стресса и разной приспособляемостью к условиям среды (Leadbetter, Breznak, 1996; Cheng et al., 2011; Lang et al., 2015; Liu et al., 2016; Mi et al., 2019; Zhou et al., 2019). Из бактериального компонента сообщества элиминировалась электроактивная потенциальная синтрофная ацетатооксиляющая (CAO) группа *Clostridium MBA03*, предположительно CAO *Lentimicrobiaceae* и представители рода *Syntrophomonas*, способные синтрофно разлагать бутират (Wu et al., 2007; Calusinska et al., 2018; Rago et al., 2018; Zheng et al., 2019). Представители рода *Caproiciproducens*, доминировавшие в К после эксперимента, способны разлагать целлюлозу при помощи внеклеточных ферментов и синтезировать среднецепочечные жирные кислоты (Xiong et al., 2019). Согласно литературным данным, представители рода *Caproiciproducens* высоко коррелировали с закислением (позитивно коррелировали с накоплением ЛЖК) при АС кукурузной соломы с высокой нагрузкой (Wang et al., 2020). Это соответствует нашим экспериментальным данным, где в контроле существенно снижался рН (5,2) и происходило накопление ЛЖК (32,02 г/л). Согласно Вэнгу с соавторами, помимо *Caproiciproducens*, представители *Clostridium*, образующие бутират, ацетат, лактат, этанол, пропанол и т.д., также положительно коррелировали с накоплением ЛЖК и закислением (Wang et al., 2020), что соответствует нашим экспериментальным данным, в частности увеличению численности групп *Clostridium sensu stricto 7* и *Clostridium sensu stricto 1* в закислившемся К. В контроле возрастала численность представителей рода *Turicibacter*, разлагающих углеводы и продуцирующих лактат, *Romboutsia*, разлагающих сахара и продуцирующих H_2 и жирные кислоты, и представителей рода *Defluviitoga*, способных сбраживать целлюлозу, хитин, ксилан и сахара (Zhang et al., 2020; Christou et al., 2021).

6.3.2. ГАУ

Инокулят ГАУ (ИнГАУ) содержал представителей архей родов *Methanothermobacter*, *Candidatus Methanoplasma*, *Methanosarcina* и *Methanoculleus* (Рисунок 27 б). Бактерии в микробном сообществе инокулята были представлены доминирующей группой *Clostridium MBA03* и в значительном количестве представителями *Hydrogenispora*, *Lentimicrobiaceae* и *Caldicoprobacter* (Рисунок 28 б). В конце эксперимента отбирались пробы из надосадочной жидкости (Жид), анализировались микроорганизмы обрастающие диатомит (Диат) и микроорганизмы, находящиеся на электропроводящем материале (ГАУ). К концу эксперимента численность архей возрастала для прикрепленных фракций (Диат и ГАУ), доминировали представители рода *Methanothermobacter*, увеличивалась численность родов *Methanosarcina*, *Methanoculleus* и *Methanomassiliicoccus*. Представители *Candidatus Methanoplasma* и

Methanomethylophilaceae RumEn M2 полностью элиминировались. Бактериальный компонент микробного сообщества всех фракций был равномерным, доминировали представители *Lentimicrobiaceae*, *Hydrogenispora*, *Clostridia MBA03* и *Defluviitoga*. Во всех фракциях были представлены группы *Clostridia DTU014* и *Clostridia D8A-2*, а численность *Caldicoprobacter* существенно снижалась.

Внесение ГАУ положительно влияло на численность гидрогенотрофных метаногенов *Methanothermobacter* и *Methanoculleus*, увеличивалась численность родов миксотрофных метаногенов *Methanosarcina* и метилотрофных *Methanomassiliicoccus* (Рисунок 27 б). Ху с соавторами отмечали, что добавление пудры активированного угля при твердофазном АС кухонных отходов положительно влияло на представителей родов *Methanoculleus*, *Methanomassiliicoccus*, *Methanobacterium*, *Methanosarcina*, *Methanospirillum* и *Methanosaeta*, и переводило ацетикластический метаногенез на гидрогенотрофный путь, аналогично нашим экспериментальным данным (Asakawa, Nagaoka, 2003; Cheng et al., 2011; Hu et al., 2023). Согласно Зиганшиной с соавторами, в термофильных системах с добавлением ГАУ было более высокое содержание представителей родов *Methanothermobacter*, *Methanoculleus*, *Methanobrevibacter* и *Methanomassiliicoccus*, что может указывать на потенциальное смещение ацетатной конверсии на САО путь (Ziganshina et al., 2022). Инокулят изначально был адаптирован за счет добавления ГАУ и содержал потенциально электроактивную САО группу *Clostridium MBA03* и предположительно САО семейство *Lentimicrobiaceae*, доминировавшие и в ходе эксперимента (Calusinska et al., 2018; Rago et al., 2018; Zheng et al., 2019). Согласно Зиганшиной и соавторам, добавление ГАУ в термофильных условиях повышает численность представителей группы *Clostridium MBA03* (Ziganshina et al., 2022), что соответствует нашим экспериментальным данным. Представители рода *Hydrogenispora*, содержащиеся в инокуляте и повышавшие численность во всех фракциях флакона с ГАУ к концу эксперимента, являются углевод-ферментирующими бактериями (Zhang et al., 2022). Однако, согласно литературным данным, при добавлении биочара, материала углеродной природы, численность представителей рода *Hydrogenispora* снижалась (Li et al., 2018). Представители рода *Caldicoprobacter*, способные к продукции H_2 , присутствуют в системах со стимуляцией межвидового переноса электронов через H_2 , что объясняет снижение численности при добавлении ГАУ и, вероятно, переходу системы к DIET (Xu et al., 2022). Существенное повышение численности представителей рода *Defluviitoga*, способных разлагать сахара, и становление одним из доминирующих родов, вероятно, связано с участием в DIET. Согласно литературным данным, внесение графена, материала углеродной природы существенно обогащало сообщество родом *Defluviitoga*, и говорило о возможной положительной роли в DIET (Lin et al., 2018). Фэнг с соавторами упоминают способность передавать электроны представителями рода *Defluviitoga* в

реакторах на основе биочара; в наших экспериментах был использован ГАУ, но, вероятно, представители рода *Defluviitoga* способны использовать не только биочар, но и ГАУ в качестве электропроводящего материала (Feng et al., 2023). Внесение ГАУ положительно сказывалось на численности представителей групп *Clostridia DTU014* и *Clostridia D8A-2*, потенциально синтрофных микроорганизмов (Lee et al., 2019).

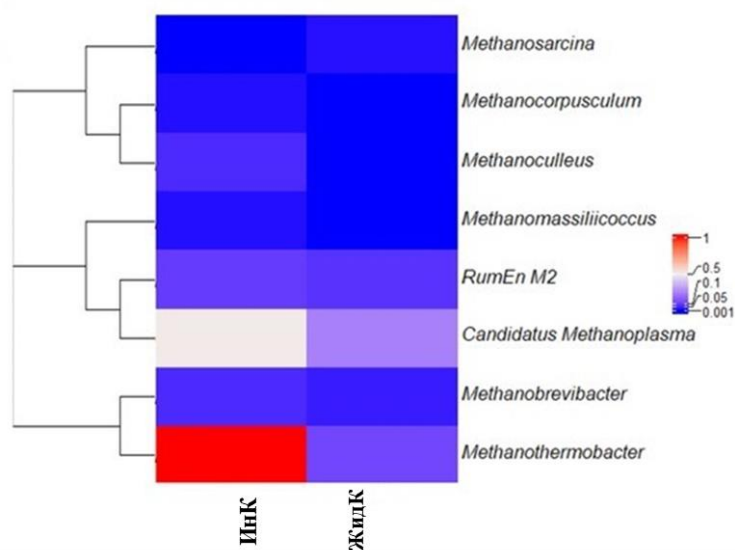
6.3.3. Магнетит

В инокуляте Маг (ИнМаг) в архейном компоненте сообщества доминировали рода *Methanothermobacter* и *Candidatus Methanoplasma*, в меньшем количестве присутствовали *Methanobrevibacter*, *Methanoculleus*, *Candidatus Methanoprogram* и *Methanosarcina* (Рисунок 25 в). В бактериальном компоненте сообщества инокулята доминировали представители группы *Clostridium MBA03* и в значительном количестве были представлены *Hydrogenispora*, *Lentimicrobiaceae* и *Caldicoprobacter*, аналогично инокуляту ГАУ (Рисунок 27 в). В конце эксперимента отбирались пробы из надосадочной жидкости (Жид), анализировались микроорганизмы обрастающие диатомит (Диат) и микроорганизмы, находящиеся на кондуктивном материале (Маг). В ходе эксперимента доминирующим родом архей для Маг становился род *Methanosarcina*, для Диат и Жид оставался *Methanothermobacter*, в меньшей степени были представлены рода *Methanoculleus* и *Methanomassiliicoccus*. Бактериальный компонент сообщества тоже менялся в ходе эксперимента, для всех фракций доминировали представители родов *Ruminiclostridium 1*, *Clostridium MBA03*, *Defluviitoga*, *Defluviitalea* и *Lentimicrobiaceae*, в меньшем количестве были представлены *Clostridia D8A-2* и *Herbinix* (Рисунок 28 в).

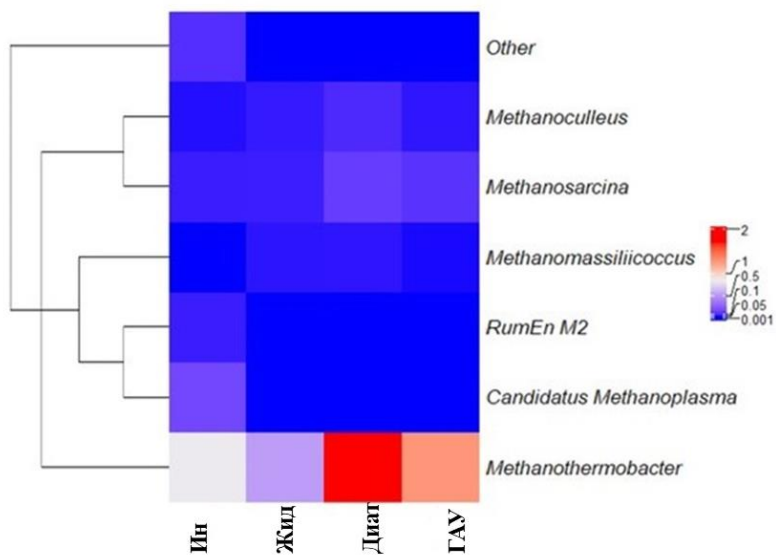
Вэнг с соавторами отметили, что при внесении магнетита в концентрации 50 мг/г СВ при твердофазном АС ОСВ увеличивалась численность архей родов *Methanoculleus*, *Methanosarcina* и *Methanospirillum* (Wang et al., 2018). В нашем же эксперименте магнетит положительно влиял на численность *Methanosarcina* и *Methanomassiliicoccus*, численность *Methanoculleus* заметно возрастала во фракции Диат. Джин с соавторами отмечали положительное влияние магнетита на представленность архей родов *Methanothermobacter* и *Methanosarcina* (Jin et al., 2019). Доминирующий в бактериальном компоненте сообщества род *Ruminiclostridium 1* является группой потенциальных САО бактерий (Zheng et al., 2019; Cai et al., 2021). Согласно Зиганшиной с соавторами, при добавлении магнетита род *Ruminiclostridium* был одним из основных представителей бактериального компонента сообщества при АС барды и свекловичного жома (Ziganshina et al., 2021), что согласуется с нашими экспериментальными данными. В другой работе, Зиганшина с соавторами отмечали положительное влияние ГАУ на количество членов рода *Ruminiclostridium 1* в термофильных условиях (Ziganshina et al., 2022). Бактерии групп *Clostridium MBA03* и *Lentimicrobiaceae*, являющиеся предположительно САО, и

Defluviitoga, предположительно участвующие в DIET, были одними из основных представителей микробного сообщества, аналогично эксперименту с ГАУ (Calusinska et al., 2018; Lin et al., 2018; Rago et al., 2018; Zheng et al., 2019; Ma et al., 2021). Согласно Ма с соавторами, представители сем. *Lentimicrobiaceae* встречались в реакторах с добавлением магнетита при АС с высокой соленостью (Ma et al., 2021). Представители рода *Defluviitalea*, способные сбраживать сахара до ЛЖК, встречались при АС кухонных отходов с добавлением магнетита (Yu et al., 2021; Zhang et al., 2023). Согласно Ли с соавторами, представители группы *Clostridia D8A-2* являются потенциальными синтрофными бактериями, осуществляющими прямой межвидовой перенос электронов, опосредованный магнетитом, с метаногенами, в том числе с *Methanosarcina* spp., доминировавшими в пробах Маг в нашем эксперименте (Lee et al., 2019). В работе Зиганшиной с соавторами, целлюлозолитический род *Herbinix* был одним из основных представителей бактериальной части сообщества при АС барды и свекловичного жома с добавлением магнетита (Ziganshina et al., 2021; Wang et al., 2023). Несмотря на то, что в нашем эксперименте численность бактерий рода *Herbinix* повышалась в сравнении с инокулятом при добавлении магнетита, он не был доминирующим родом.

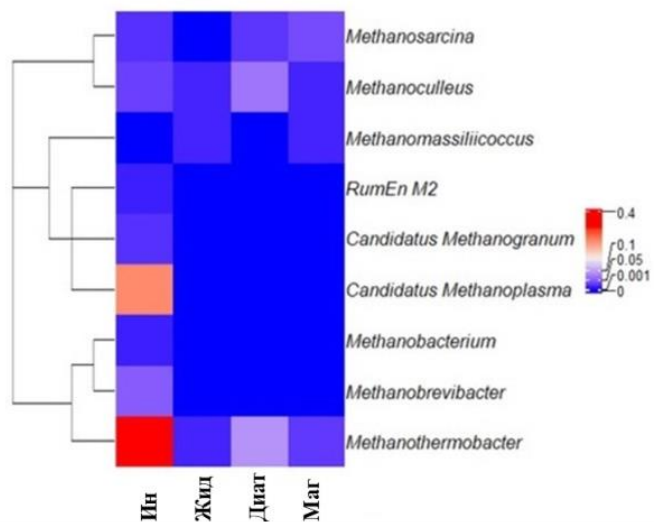
Таким образом, добавление ГАУ и магнетита в качестве электропроводящего материала стимулировало развитие электрогенных и синтрофных групп микроорганизмов, в том числе и потенциальных САО. Можно отметить, что в сообществе преобладали разные специфические группы в зависимости от добавленного материала, для ГАУ это члены групп *Lentimicrobiaceae*, *Hydrogenispora*, *Clostridia MBA0* и *Defluviitoga*, а для Маг – *Ruminiclostridium 1*, *Clostridium MBA03*, *Defluviitoga*, *Defluviitalea* и *Lentimicrobiaceae* (Рисунок 29).



а

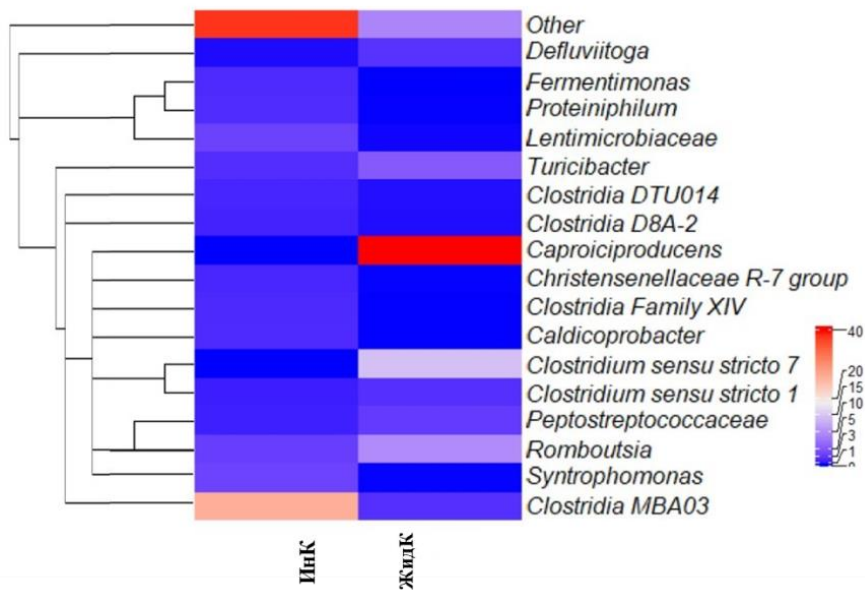


б

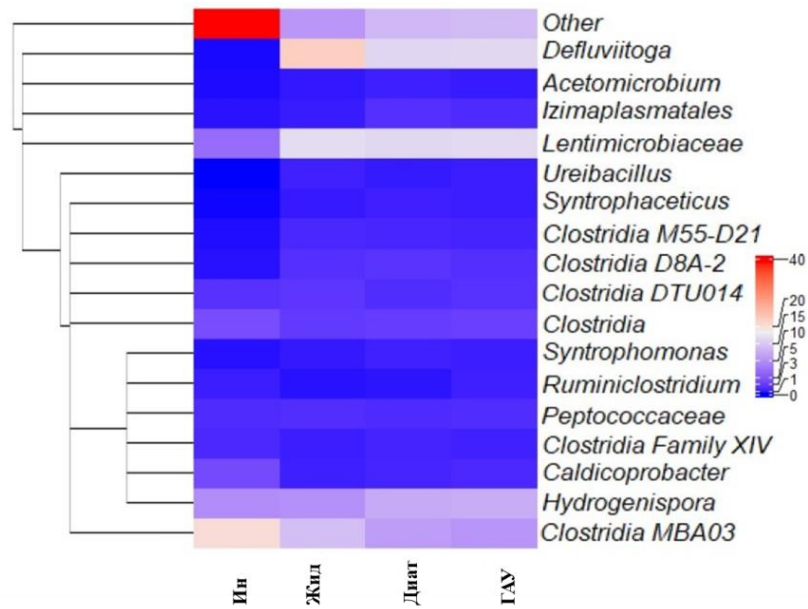


в

Рисунок 27. Профиль архейного компонента сообщества для К (а), ГАУ (б) и Маг (в) на уровне родов при твердофазном АС ОФ-ТКО.



a



б

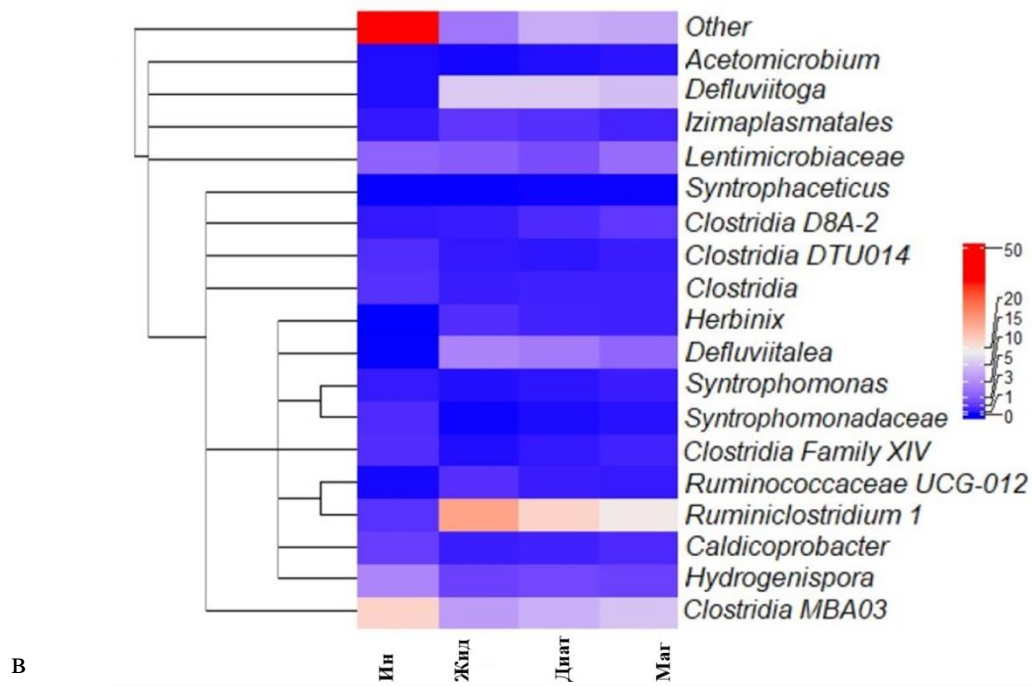
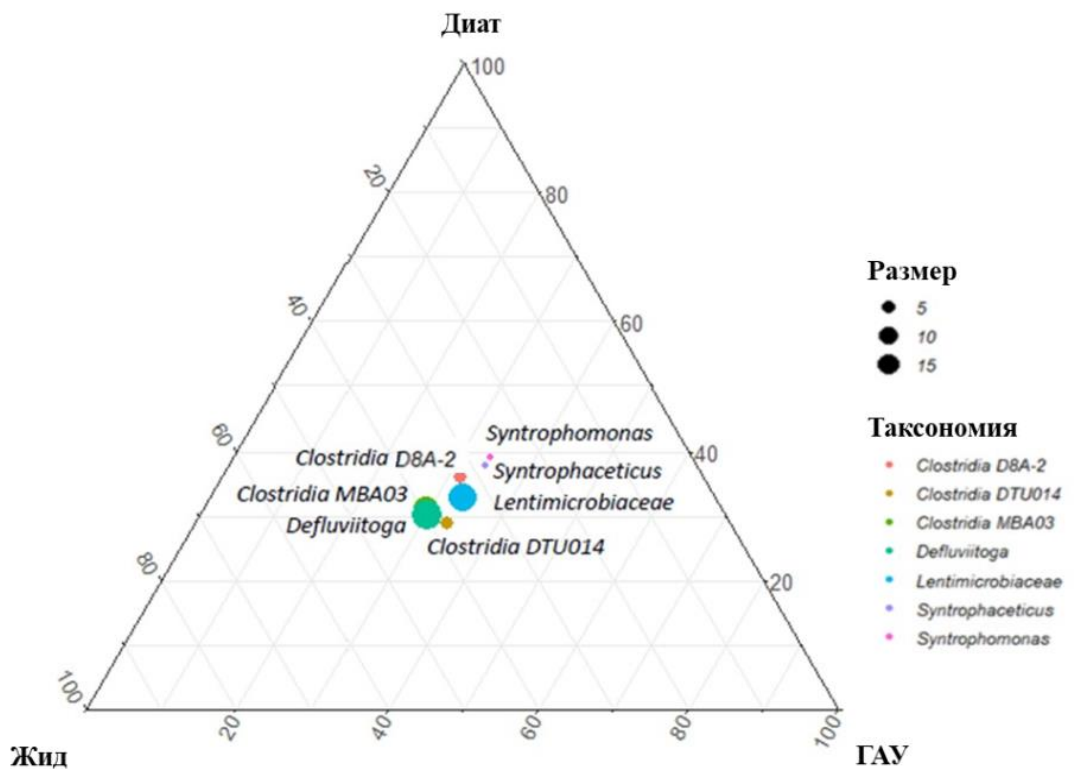


Рисунок 28. Профиль бактериального компонента сообщества для К (а), ГАУ (б) и Маг (в) на уровне родов при твердофазном АС ОФ-ТКО.



а

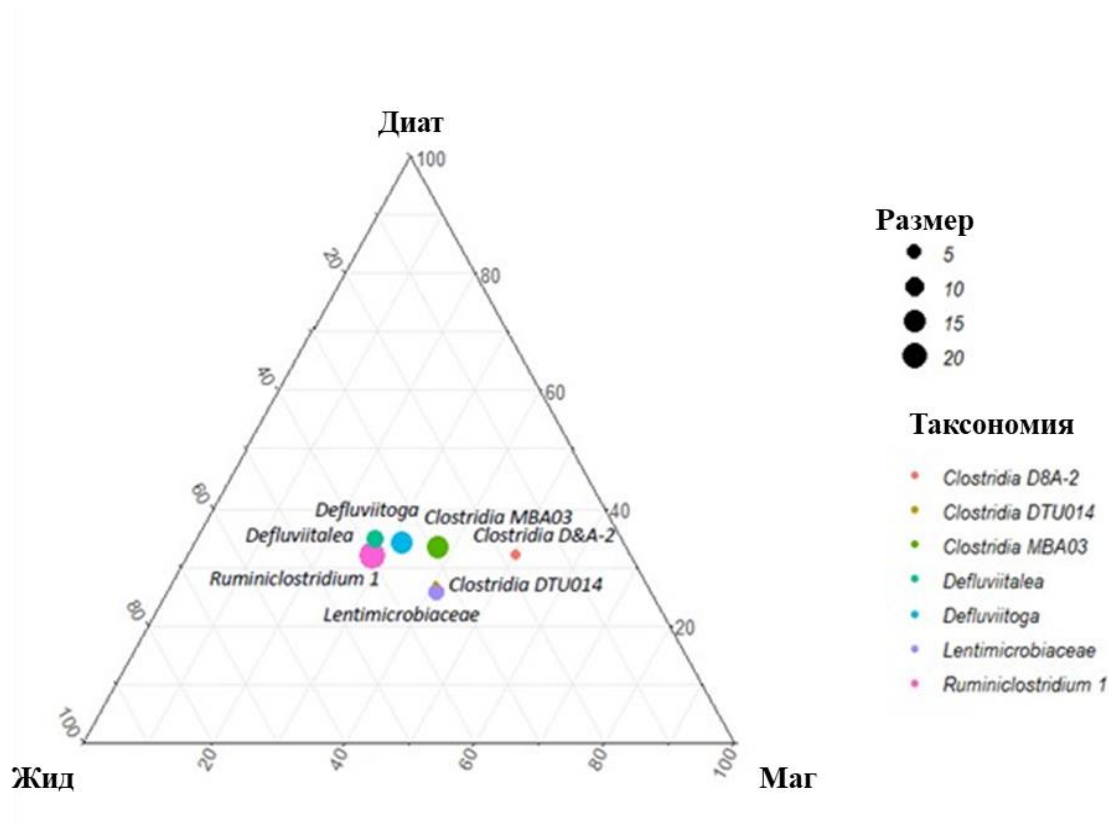


Рисунок 29. Тройная диаграмма, указывающая на обогащенный род, каждая точка соответствует роду для ГАУ (а) и Маг (б).

Основные результаты и выводы по Главе 6.

Согласно результатам эксперимента 3, можно отметить, что 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) с ингибированным метаногенезом в контрольных реакторах. Флаконы с более высокой дозировкой проводящих материалов (20 г) показали лучшие результаты; флаконы с добавлением магнетита демонстрируют самый высокий выход метана (286 мл $\text{CH}_4/\text{г ОВ}$), а флаконы с добавлением ГАУ демонстрируют более высокие максимальные скорости производства CH_4 (26,38 мл $\text{CH}_4/(\text{г ОВ сутки})$) и более короткую лаг-фазу (2,83 дня). Наличие пилеподобных структур на поверхности проводящих материалов позволяет предположить, что в этих биопленках вероятно протекали разные типы ДИЕТ, в дополнение к ДИЕТ с ЭМ. Обогащение биопленок на ГАУ и магнетите различными синтрофными и потенциально электроактивными микробными группами свидетельствует о наличии специфических предпочтений этих групп к природе материала. Будущие исследования в непрерывном режиме могут показать перспективность использования предложенной двухфазной термофильной системы твердофазного АС для достижения стабильного и эффективного метаногенеза при экономии затрат на дозирование проводящих материалов.

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 т.п. 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/(м³ 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 *Theridanaerobacter*, а также *Defluviitoga*, способного к DIET в смешанной культуре с представителями доминирующего в этой биопленке архейного рода *Methanothrix*. 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 низкоконцентрированного 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/(м³ 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 СОКРАЩЕНИЙ

BMP – англ. biochemical methane potential – биохимический метановый потенциал

C:N – соотношение углерода и азота

DIET – англ. direct interspecies electrons transfer – прямой межвидовой перенос электронов

IFT – англ. interspecies formate transfer – межвидовой перенос формиата

ИHT – англ. interspecies hydrogen transfer – межвидовой перенос водорода

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

RDA – англ. redundancy analysis – анализ избыточности

SRT – англ. solid retention time – время удержания твердых веществ

АС – анаэробное сбраживание

АСМ – атомно-силовая микроскопия

ГАУ (GAC) – гранулированный активированный уголь – англ. granular activated carbon

ГВУ – гидравлическое время удержания

ГМФ – гидроксиметилфурфурол

ГПО – гидротермическая предварительная обработка

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ДЦЖК – длинноцепочечные жирные кислоты

КЛСМ – конфокальная лазерная сканирующая микроскопия

КРС – навоз крупного рогатого скота

ЛЖК – летучие жирные кислоты

МВ – микроволны

МПЭ (IET) – межвидовой перенос электронов – англ. interspecies electron transfer

ОВ – органическое вещество

ОСВ – осадок сточных вод

ОФ-ТКО – органическая фракция твердых коммунальных отходов

ППО – паротермическая предварительная обработка

ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия

САО – синтрофное окисление ацетата

СВ – сухое вещество

СС – совместное сбраживание

СТМ – сканирующая туннельная микроскопия

СЭМ – сканирующая электронная микроскопия

ТБО – твердые бытовые отходы

ТКО – твердые коммунальные отходы

ТФ АС – твердофазное анаэробное сбраживание

ХПК – химическое потребление кислорода

ЭМ – электропроводящие материалы

ЭПС – экзополисахариды

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ножевникова А. Н., Каллистова А.Ю., Литти Ю.В., Кевбрина М.В. Биотехнология и микробиология анаэробной переработки органических коммунальных отходов // М.: Университетская книга. – 2016. – №. 2008. – С. 320.
2. Шилкина С. В. Мировые тенденции управления отходами и анализ ситуации в России // Интернет-журнал «Отходы и ресурсы» – 2020. – Т. 7. – №. 1. – С. 1-10.
3. Abbas Y., Yun S., Wang Z., Zhang Y., Zhang X., Wang K. Recent advances in bio-based carbon materials for anaerobic digestion: A review // Renewable and Sustainable Energy Reviews. – 2021. – V. 135. – P. 110378.
4. Adekunle K., Okolie J. A review of biochemical process of anaerobic digestion // Advances in Bioscience and Biotechnology. – 2015. – V. 6. – №. 03. – P. 205-212.
5. Adu-Gyamfi N., Ravella S., Hobbs P. Optimizing anaerobic digestion by selection of the immobilizing surface for enhanced methane production // Bioresource Technology. – 2012. – V. 120. – P. 248-255.
6. Agarwal N., Kumar M., Ghosh P., Kumar S., Singh L., Vijay V., Kumar V. Anaerobic digestion of sugarcane bagasse for biogas production and digestate valorization // Chemosphere. – 2022. – V. 295. – P. 133893.
7. Agbor V., Cicek N., Sparling R., Berlin A., Levin D. Biomass pretreatment: fundamentals toward application // Biotechnology Advances. – 2011. – V. 29. – №. 6. – P. 675-685.
8. Ahmad F., Silva E., Varesche M. Hydrothermal processing of biomass for anaerobic digestion – a review // Renewable and Sustainable Energy Reviews. – 2018. – V. 98. – P. 108-124.
9. 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.
10. Ajay C., Mohan S., Dinesha P., Rosen M. Review of impact of nanoparticle additives on anaerobic digestion and methane generation // Fuel. – 2020. – V. 277. – P. 118234.
11. Akil K., Jayanthi S. Anaerobic sequencing batch reactors and its influencing factors: an overview // Journal of Environmental Science and Engineering. – 2012. – V. 54. – №. 2. – P. 317-322.
12. Akindolire M., Rama H., Roopnarain A. Psychrophilic anaerobic digestion: A critical evaluation of microorganisms and enzymes to drive the process // Renewable and Sustainable Energy Reviews. – 2022. – V. 161. – P. 112394.

13. Akturk S., Demirer G. Improved food waste stabilization and valorization by anaerobic digestion through supplementation of conductive materials and trace elements // Sustainability. – 2020. – V. 12. – №. 12. – P. 5222.
14. Al Hasani Z., Nayak J., Alhimali H., Al-Mamun A. Enhancing methane production of co-digested food waste with granular activated carbon coated with nano zero-valent iron in an anaerobic digester // Bioresource Technology. – 2022. – V. 363. – P. 127832.
15. Alavi-Borazjani S., Capela I., Tarelho L. Over-acidification control strategies for enhanced biogas production from anaerobic digestion: A review // Biomass and Bioenergy. – 2020. – V. 143. – P. 105833.
16. Amin F., Khalid H., Zhang H., Rahman S.U., Zhang R., Liu G., Chen C. Pretreatment methods of lignocellulosic biomass for anaerobic digestion // AMB Express. – 2017. – V. 7. – P. 1-12.
17. Angelidaki I., Karakashev D., Batstone J.D., Plugge C.M., Stams J.M.A. Biomethanation and its potential // Methods in Enzymology. – 2011. – V. 494. – P. 328-347.
18. Anshassi M., Smallwood T., Townsend T.G. Life cycle GHG emissions of MSW landfilling versus Incineration: Expected outcomes based on US landfill gas collection regulations // Waste Management. – 2022. – V. 142. – P. 44-54.
19. Ao T., Xie Z., Zhou P., Liu X., Wan L., Li D. Comparison of microbial community structures between mesophilic and thermophilic anaerobic digestion of vegetable waste // Bioprocess and Biosystems Engineering. – 2021. – V. 44. – P. 1201-1214.
20. AOAC Int. Official Methods of Analysis. 17th ed. AOAC Int., Arlington, VA Assoc. Off. Anal. Chem. Rockville, MD, USA, 2000.
21. Apul O.G., Sanin F.D. Ultrasonic pretreatment and subsequent anaerobic digestion under different operational conditions // Bioresource Technology. – 2010. – V. 101. – №. 23. – P. 8984-8992.
22. Ariunbaatar J., Panico A., Esposito G., Pirozzi F., Lens P.N. Pretreatment methods to enhance anaerobic digestion of organic solid waste // Applied Energy. – 2014. – V. 123. – P. 143-156.
23. Asakawa S., Nagaoka K. *Methanoculleus bourgensis*, *Methanoculleus olentangyi* and *Methanoculleus oldenburgensis* are subjective synonyms // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2003. – V. 53. – №. 5. – P. 1551-1552.
24. Astals S., Batstone D.J., Mata-Alvarez J., Jensen P.D. Identification of synergistic impacts during anaerobic co-digestion of organic wastes // Bioresource Technology. – 2014. – V. 169. – P. 421-427.
25. Atelge M.R., Atabani A.E., Banu J.R., Krisa D., Kaya M., Eskicioglu C., Duman F. A critical review of pretreatment technologies to enhance anaerobic digestion and energy recovery // Fuel. – 2020. – V. 270. – P. 117494.

26. Baek G., Kim J., Kim J., Lee C. Role and potential of direct interspecies electron transfer in anaerobic digestion // *Energies*. – 2018. – V. 11. – №. 1. – P. 107.
27. Baek G., Kim J., Lee C. A long-term study on the effect of Magnetite supplementation in continuous anaerobic digestion of dairy effluent – Enhancement in process performance and stability // *Bioresource Technology*– 2016. – V. 222. – P. 344-354.
28. Baek G., Rossi R., Saikaly P.E., Logan B.E. The impact of different types of high surface area brush fibers with different electrical conductivity and biocompatibility on the rates of methane generation in anaerobic digestion // *Science of The Total Environment*. – 2021. – V. 787. – P. 147683.
29. Bajpai P., Bajpai P. Basics of anaerobic digestion process // *Anaerobic technology in pulp and paper industry*. – Springer Nature. – 2017. – P. 7-12.
30. Barua S., Dhar B.R. Advances towards understanding and engineering direct interspecies electron transfer in anaerobic digestion // *Bioresource Technology*. – 2017. – V. 244. – P. 698-707.
31. Bella K., Rao P.V. Anaerobic digestion of dairy wastewater: Effect of different parameters and co-digestion options–A review // *Biomass Conversion and Biorefinery*. – 2023. – V. 13. – P. 2527-2552.
32. Blumensaat F., Keller J. Modelling of two-stage anaerobic digestion using the IWA Anaerobic Digestion Model No. 1 (ADM1) // *Water Research*. – 2005. – V. 39. – №. 1. – P. 171-183.
33. Bogachev M.I., Volkov V.Y., Markelov O.A., Trizna E.Y., Baydamshina D.R., Melnikov V., Murtazina R.R., Zelenikhin P.V., Sharafutdinov I.S., Kayumov A.R. Fast and simple tool for the quantification of biofilm-embedded cells sub-populations from fluorescent microscopic iMages // *PLoS One*. – 2018. – V. 13. – №. 5. – P. e0193267.
34. Borowski S. Temperature-phased anaerobic digestion of the hydromechanically separated organic fraction of municipal solid waste with sewage sludge // *International Biodeterioration & Biodegradation*. – 2015. – V. 105. – P. 106-113.
35. Borrel G., O’Toole P.W., Harris H.M., Peyret P., Brugere J.F., Gribaldo S. Phylogenomic data support a seventh order of methylotrophic methanogens and provide insights into the evolution of methanogenesis // *Genome Biology and Evolution*. – 2013. – V. 5. – №. 10. – P. 1769-1780.
36. Boscaro M.E., Marin D. F.C., da Silva D.C., Maintinguer S.I. Effect of Fe₃O₄ nanoparticles on microbial diversity and biogas production in anaerobic digestion of crude glycerol // *Biomass and Bioenergy*. – 2022. – V. 160. – P. 106439.
37. Bozkurt Y.C., Apul O.G. Critical review for microwave pretreatment of waste-activated sludge prior to anaerobic digestion // *Current Opinion in Environmental Science & Health*. – 2020. – V. 14. – P. 1-9.

38. Brémond U., de Buyer R., Steyer J.P., Bernet N., Carrere H. Biological pretreatments of biomass for improving biogas production: an overview from lab scale to full-scale // *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. – 2018. – V. 90. – P. 583-604.
39. Cai G., Zhu G., Zhou M., Lv N., Wang R., Li C., Pan, X. Syntrophic butyrate-oxidizing methanogenesis promoted by anthraquinone-2-sulfonate and cysteine: Distinct tendencies towards the enrichment of methanogens and syntrophic fatty-acid oxidizing bacteria // *Bioresource Technology*. – 2021. – V. 332. – P. 125074.
40. Cai Y., Zheng Z., Wang X. Obstacles faced by methanogenic archaea originating from substrate-driven toxicants in anaerobic digestion // *Journal of Hazardous Materials*. – 2021. – V. 403. – P. 123938.
41. Calusinska M., Goux X., Fossépré M., Muller E.E., Wilmes P., Delfosse P. A year of monitoring 20 mesophilic full-scale bioreactors reveals the existence of stable but different core microbiomes in bio-waste and wastewater anaerobic digestion systems // *Biotechnology for Biofuels*. – 2018. – V. 11. – №. 1. – P. 1-19.
42. Canan A., Calhan R., Ozkaymak M. Investigation of the effects of different slags as accelerant on anaerobic digestion and methane yield // *Biomass Conversion and Biorefinery*. – 2021. – V. 11. – №. 4. – P. 1395-1406.
43. Caporaso J.G., Kuczynski J., Stombaugh J., Bittinger K., Bushman F.D., Costello E.K., Knight R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data // *Nature Methods*. – 2010. – V. 7. – №. 5. – P. 335-336.
44. Cardona L., Mazéas L., Chapleur O. Deterministic processes drive the microbial assembly during the recovery of an anaerobic digester after a severe ammonia shock // *Bioresource Technology*. – 2022. – V. 347. – P. 126432.
45. Cavali M., Junior N. L., de Almeida Mohedano R., Belli Filho P., da Costa R.H.R., de Castilhos Junior, A.B. Biochar and hydrochar in the context of anaerobic digestion for a circular approach: An overview // *Science of The Total Environment*. – 2022. – V. 822. – P. 153614.
46. Cavinato C., Bolzonella D., Pavan P., Fatone F., Cecchi F. Mesophilic and thermophilic anaerobic co-digestion of waste activated sludge and source sorted biowaste in pilot- and full-scale reactors // *Renewable Energy*. – 2013. – V. 55. – P. 260-265.
47. Cheng L., Dai L., Li X., Zhang H., Lu Y. Isolation and characterization of *Methanothermobacter crinale* sp. nov., a novel hydrogenotrophic methanogen from the Shengli oil field // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2011. – V. 77. – №. 15. – P. 5212-5219.

48. Cheng Q., Call D.F. Hardwiring microbes via direct interspecies electron transfer: mechanisms and applications // *Environmental Science: Processes & Impacts*. – 2016. – V. 18. – №. 8. – P. 968-980.
49. Chiu S.L.H., Lo I.M.C. Reviewing the anaerobic digestion and co-digestion process of food waste from the perspectives on biogas production performance and environmental impacts // *Environmental Science and Pollution Research*. – 2016. – V. 23. – P. 24435-24450.
50. Choong Y.Y., Norli I., Abdullah A.Z., Yhaya M.F. Impacts of trace element supplementation on the performance of anaerobic digestion process: A critical review // *Bioresource Technology*. – 2016. – V. 209. – P. 369-379.
51. Chowdhury T.H. Technical-economical analysis of anaerobic digestion process to produce clean energy // *Energy Reports*. – 2021. – V. 7. – P. 247-253.
52. Christou M.L., Vasileiadis S., Karpouzas D.G., Angelidaki I., Kotsopoulos T.A. Effects of organic loading rate and hydraulic retention time on bioaugmentation performance to tackle ammonia inhibition in anaerobic digestion // *Bioresource Technology*. – 2021. – V. 334. – P. 125246.
53. Chu L., Yan S., Xing X.H., Sun X., Jurcik B. Progress and perspectives of sludge ozonation as a powerful pretreatment method for minimization of excess sludge production // *Water Research*. – 2009. – V. 43. – №. 7. – P. 1811-1822.
54. Collins M.D., Lawson P.A., Willems A., Cordoba J.J., Fernandez-Garayzabal J., Garcia P., Farrow J.A.E. The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 1994. – V. 44. – №. 4. – P. 812-826.
55. Cruz I.A., Chuenchart W., Long F., Surendra K.C., Andrade L.R.S., Bilal M., Liu H., Figueiredo R., Khanal S., Ferreira, L.F.R. Application of machine learning in anaerobic digestion: Perspectives and challenges // *Bioresource Technology*. – 2022. – V. 345. – P. 126433.
56. Cui Y., Mao F., Zhang J., He Y., Tong Y.W., Peng Y. Biochar enhanced high-solid mesophilic anaerobic digestion of food waste: Cell viability and methanogenic pathways // *Chemosphere*. – 2021. – V. 272. – P. 129863.
57. Dai L., He C., Wang Y., Liu Y., Ruan R., Yu Z., Zhao Y. Hydrothermal pretreatment of bamboo sawdust using microwave irradiation // *Bioresource technology*. – 2018. – V. 247. – P. 234-241.
58. Dang Y., Holmes D.E., Zhao Z., Woodard T.L., Zhang Y., Sun D., Lovley D.R. Enhancing anaerobic digestion of complex organic waste with carbon-based conductive materials // *Bioresource Technology*. – 2016. – V. 220. – P. 516-522.

59. de Albuquerque F.P., Dastyar W., Azizi S.M.M., Zakaria B.S., Kumar A., Dhar B.R. Carbon cloth amendment for boosting high-solids anaerobic digestion with percolate recirculation: Spatial patterns of microbial communities // *Chemosphere*. – 2022. – V. 307. – P. 135606.
60. De Bok F.A.M., Plugge C.M., Stams A.J.M. Interspecies electron transfer in methanogenic propionate degrading consortia // *Water Research*. – 2004. – V. 38. – №. 6. – P. 1368-1375.
61. 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. – №. 8. – P. 1902-1907.
62. Duque A., Manzanares P., Ballesteros I., Ballesteros M. Steam explosion as lignocellulosic biomass pretreatment // *Biomass fractionation technologies for a lignocellulosic feedstock based biorefinery*. – Elsevier, 2016. – P. 647.
63. Dyksma S., Jansen L., Gallert C. Syntrophic acetate oxidation replaces acetoclastic methanogenesis during thermophilic digestion of biowaste // *Microbiome*. – 2020. – V. 8. – №. 1. – P. 105.
64. Elliott A., Mahmood T. Pretreatment technologies for advancing anaerobic digestion of pulp and paper biotreatment residues // *Water research*. – 2007. – V. 41. – №. 19. – P. 4273-4286.
65. Fadrosch D.W., Ma B., Gajer P., Sengamalay N., Ott S., Brotman R.M., Ravel J. An improved dual-indexing approach for multiplexed 16S rRNA gene sequencing on the Illumina MiSeq platform // *Microbiome*. – 2014. – V. 2. – №. 1. – P. 1-7.
66. Fagbohunge M.O., Dodd I.C., Herbert B.M., Li H., Ricketts L., Semple K.T. High solid anaerobic digestion: Operational challenges and possibilities // *Environmental Technology & Innovation*. – 2015. – V. 4. – P. 268-284.
67. Feng D., Xia A., Wu S., Huang Y., Zhu X., Zhu X., Liao Q. Magnetite as a means to enhance anaerobic digestion of furfural // *Journal of Cleaner Production*. – 2022. – V. 381. – P. 135139.
68. Feng L., He S., Gao Z., Zhao W., Jiang J., Zhao Q., Wei L. Mechanisms, performance, and the impact on microbial structure of direct interspecies electron transfer for enhancing anaerobic digestion-A review // *Science of The Total Environment*. – 2023. – V. 862. – P. 160813.
69. Ferdes M., Dincă M.N., Moiceanu G., Zăbavă B.Ş., Paraschiv G. Microorganisms and enzymes used in the biological pretreatment of the substrate to enhance biogas production: A review // *Sustainability*. – 2020. – V. 12. – №. 17. – P. 7205.
70. Fernandes T., Vaz-Moreira I., Manaia C.M. Neighbor urban wastewater treatment plants display distinct profiles of bacterial community and antibiotic resistance genes // *Environmental Science and Pollution Research*. – 2019. – V. 26. – P. 11269-11278.

71. Fitamo T., Treu L., Boldrin A., Sartori C., Angelidaki I., Scheutz C. Microbial population dynamics in urban organic waste anaerobic co-digestion with mixed sludge during a change in feedstock composition and different hydraulic retention times // *Water Research*. – 2017. – V. 118. – P. 261-271.
72. Florentino A.P., Sharaf A., Zhang L., Liu Y. Overcoming ammonia inhibition in anaerobic blackwater treatment with granular activated carbon: the role of electroactive microorganisms // *Environmental Science: Water Research & Technology*. – 2019. – V. 5. – №. 2. – P. 383-396.
73. Fouad H. A., Aboufotouh A. M., El-hefnay R., Marie A. I. Anaerobic co-digestion of sewage sludge and waste—A review with a focus on the mixing ratios, pre-treatment, and challenges // *International Journal of Research in Engineering and Technology*. – 2022. – V. 9. – №. 3. – P. 282-290.
74. Franca L.S., Bassin J.P. The role of dry anaerobic digestion in the treatment of the organic fraction of municipal solid waste: A systematic review // *Biomass and Bioenergy*. – 2020. – V. 143. – P. 105866.
75. Fugol M., Prask H., Szlachta J., Dyjakon A., Paśławska M., Szufa S. Improving the energetic efficiency of biogas plants using enzymatic additives to anaerobic digestion // *Energies*. – 2023. – V. 16. – №. 4. – P. 1845.
76. Gahlot P., Ahmed B., Tiwari S.B., Aryal N., Khursheed A., Kazmi A.A., Tyagi V.K. Conductive material engineered direct interspecies electron transfer (DIET) in anaerobic digestion: mechanism and application // *Environmental Technology & Innovation*. – 2020. – V. 20. – P. 101056.
77. Gebreyessus G.D., Jenicek P. Thermophilic versus mesophilic anaerobic digestion of sewage sludge: a comparative review // *Bioengineering*. – 2016. – V. 3. – №. 2. – P. 15.
78. Gohl D.M., MacLean A., Hauge A., Becker A., Walek D., Beckman K. B. An optimized protocol for high-throughput amplicon-based microbiome profiling. // *Protocol Exchange*. – 2016.
79. Gorby Y.A., Yanina S., McLean J.S., Rosso K.M., Moyles D., Dohnalkova A., Fredrickson J.K. Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 and other microorganisms // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2006. – V. 103. – №. 30. – P. 11358-11363.
80. Griffin M.E., McMahon K.D., Mackie R.I., Raskin L. Methanogenic population dynamics during start-up of anaerobic digesters treating municipal solid waste and biosolids // *Biotechnology and Bioengineering*. – 1998. – V. 57. – №. 3. – P. 342-355.

81. Guan Q., Qu Y., Zhai Y., Shi W., Zhao M., Huang Z., Ruan W. Enhancement of methane production in anaerobic digestion of high salinity organic wastewater: The synergistic effect of nano-Magnetite and potassium ions // *Chemosphere*. – 2023. – V. 318. – P. 137974.
82. Guo X., Wang C., Sun F., Zhu W., Wu W. A comparison of microbial characteristics between the thermophilic and mesophilic anaerobic digesters exposed to elevated food waste loadings // *Bioresource Technology*. – 2014. – V. 152. – P. 420-428.
83. Hagos K., Zong J., Li D., Liu C., Lu X. Anaerobic co-digestion process for biogas production: Progress, challenges and perspectives // *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. – 2017. – V. 76. – P. 1485-1496.
84. Hashemi B., Horn S.J., Lamb J.J., Lien K.M. Potential role of sulfide precipitates in direct interspecies electron transfer facilitation during anaerobic digestion of fish silage // *Bioresource Technology Reports*. – 2022. – V. 20. – P. 101264.
85. Heitkamp K., Latorre-Pérez A., Nefigmann S., Gimeno-Valero H., Vilanova C., Jahmad E., Abendroth C. Monitoring of seven industrial anaerobic digesters supplied with biochar // *Biotechnology for Biofuels*. – 2021. – V. 14. – P. 1-14.
86. Heydorn A., Nielsen A.T., Hentzer M., Sternberg C., Givskov M., Ersboll B.K., Molin S. Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT // *Microbiology*. – 2000. – V. 146. – №. 10. – P. 2395-2407.
87. Holliger C., Fruteau de Laclos H., Hack G. Methane production of full-scale anaerobic digestion plants calculated from substrate's biomethane potentials compares well with the one measured on-site // *Frontiers in Energy Research*. – 2017. – V. 5. – P. 12.
88. Hu A.Y., Stuckey D.C. Activated carbon addition to a submerged anaerobic membrane bioreactor: effect on performance, transmembrane pressure, and flux // *Journal of Environmental Engineering*. – 2007. – V. 133. – №. 1. – P. 73-80.
89. Hu Q., Sun D., Ma Y., Qiu B., Guo Z. Conductive polyaniline nanorods enhanced methane production from anaerobic wastewater treatment // *Polymer*. – 2017. – V. 120. – P. 236-243.
90. Hu Y., Wang X., Zhang S., Liu S., Hu T., Wang X., Hu F. Microbial response behavior to powdered activated carbon in high-solids anaerobic digestion of kitchen waste: Metabolism and functional prediction analysis // *Journal of Environmental Management*. – 2023. – V. 337. – P. 117756.
91. Imachi H., Sakai S., Ohashi A., Harada H., Hanada S., Kamagata Y., Sekiguchi Y. *Pelotomaculum propionicicum* sp. nov., an anaerobic, mesophilic, obligately syntrophic, propionate-oxidizing bacterium // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2007. – V. 57. – №. 7. – P. 1487-1492.

92. Jabari L., Gannoun H., Cayol J.L., Hamdi M., Fauque G., Ollivier B., Fardeau M.L. Characterization of *Defluviitalea saccharophila* gen. nov., sp. nov., a thermophilic bacterium isolated from an upflow anaerobic filter treating abattoir wastewaters, and proposal of *Defluviitaleaceae* fam. nov // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2012. – V. 62. – №. 3. – P. 550-555.
93. Jain S., Jain S., Wolf I.T., Lee J., Tong Y.W. A comprehensive review on operating parameters and different pretreatment methodologies for anaerobic digestion of municipal solid waste // Renewable and Sustainable Energy Reviews. – 2015. – V. 52. – P. 142-154.
94. Jiang J., Li L., Li Y., He Y., Wang C., Sun Y. Bioaugmentation to enhance anaerobic digestion of food waste: Dosage, frequency and economic analysis // Bioresource Technology. – 2020. – V. 307. – P. 123256.
95. Jin Z., Zhao Z., Zhang Y. Potential of direct interspecies electron transfer in synergetic enhancement of methanogenesis and sulfate removal in an up-flow anaerobic sludge blanket reactor with magnetite // Science of The Total Environment. – 2019. – V. 677. – P. 299-306.
96. Juibari M.M., Abbasalizadeh S., Jouzani G.S., Noruzi M. Intensified biosynthesis of silver nanoparticles using a native extremophilic *Ureibacillus thermosphaericus* strain // Materials Letters. – 2011. – V. 65. – №. 6. – P. 1014-1017.
97. Junior I.V., de Almeida R., Cammarota M.C. A review of sludge pretreatment methods and co-digestion to boost biogas production and energy self-sufficiency in wastewater treatment plants // Journal of Water Process Engineering. – 2021. – V. 40. – P. 101857.
98. Kakar F.L., Tadesse F., Elbeshbishy E. Comprehensive review of hydrothermal pretreatment parameters affecting fermentation and anaerobic digestion of municipal sludge // Processes. – 2022. – V. 10. – №. 12. – P. 2518.
99. Kamagata Y., Kawasaki H., Oyaizu H., Nakamura K., Mikami E., Endo G., Yamasato K. Characterization of three thermophilic strains of *Methanotherix* (“*Methanosaeta*”) *thermophila* sp. nov. and rejection of *Methanotherix* (“*Methanosaeta*”) *thermoacetophila* // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 1992. – V. 42. – №. 3. – P. 463-468.
100. Kang H.J., Lee S.H., Lim T.G., Park J.H., Kim B., Buffière P., Park H.D. Recent advances in methanogenesis through direct interspecies electron transfer via conductive materials: A molecular microbiological perspective // Bioresource Technology. – 2021. – V. 322. – P. 124587.
101. Karki R., Chuenchart W., Surendra K.C., Shrestha S., Raskin L., Sung S., Khanal S.K. Anaerobic co-digestion: Current status and perspectives // Bioresource Technology. – 2021. – V. 330. – P. 125001.

102. Keucken A., Habagil M., Batstone D., Jeppsson U., Arnell M. Anaerobic co-digestion of sludge and organic food waste—Performance, inhibition, and impact on the microbial community // *Energies*. – 2018. – V. 11. – №. 9. – P. 2325.
103. Khadaroo S.N., Poh P.E., Gouwanda D., Grassia P. Applicability of various pretreatment techniques to enhance the anaerobic digestion of Palm oil Mill effluent (POME): A review // *Journal of Environmental Chemical Engineering*. – 2019. – V. 7. – №. 5. – P. 103310.
104. Khalid A., Arshad M., Anjum M., Mahmood T., Dawson L. The anaerobic digestion of solid organic waste // *Waste Management*. – 2011. – V. 31. – №. 8. – P. 1737-1744.
105. Khan M.A., Khan S.T., Sequeira M.C., Faheem S.M., Rais N. Illumina sequencing of 16S rRNA genes reveals a unique microbial community in three anaerobic sludge digesters of Dubai // *Plos One*. – 2021. – V. 16. – №. 4. – P. e0249023.
106. Kim D., Lee K., Park K.Y. Enhancement of biogas production from anaerobic digestion of waste activated sludge by hydrothermal pre-treatment // *International Biodeterioration & Biodegradation*. – 2015. – V. 101. – P. 42-46.
107. Kim E., Lee J., Han G., Hwang S. Comprehensive analysis of microbial communities in full-scale mesophilic and thermophilic anaerobic digesters treating food waste-recycling wastewater // *Bioresource Technology*. – 2018. – V. 259. – P. 442-450.
108. Kothari R., Pandey A.K., Kumar S., Tyagi V.V., Tyagi S.K. Different aspects of dry anaerobic digestion for bio-energy: An overview // *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. – 2014. – V. 39. – P. 174-195.
109. Kougias P.G., Treu L., Benavente D.P., Boe K., Campanaro S., Angelidaki I. Ex-situ biogas upgrading and enhancement in different reactor systems // *Bioresource Technology*. – 2017. – V. 225. – P. 429-437.
110. Kumar V., Nabaterega R., Khoei S., Eskicioglu C. Insight into interactions between syntrophic bacteria and archaea in anaerobic digestion amended with conductive materials // *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. – 2021. – V. 144. – P. 110965.
111. Kumari D., Singh R. Pretreatment of lignocellulosic wastes for biofuel production: A critical review // *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. – 2018. – V. 90. – P. 877-891.
112. Kurade M.B., Saha S., Salama E.S., Patil S.M., Govindwar S.P., Jeon B.H. Acetoclastic methanogenesis led by *Methanosarcina* in anaerobic co-digestion of fats, oil and grease for enhanced production of methane // *Bioresource Technology*. – 2019. – V. 272. – P. 351-359.
113. Kymäläinen M., Lähde K., Arnold M., Kurola J.M., Romantschuk M., Kautola H. Biogasification of biowaste and sewage sludge – Measurement of biogas quality // *Journal of Environmental Management*. – 2012. – V. 95. – P. 122-127.

114. Laiq Ur Rehman M., Iqbal A., Chang C.C., Li W., Ju M. Anaerobic digestion // *Water Environment Research*. – 2019. – V. 91. – №. 10. – P. 1253-1271.
115. 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. – №. 4. – P. 1338-1352.
116. Leadbetter J.R., Breznak J.A. Physiological ecology of *Methanobrevibacter cuticularis* sp. nov. and *Methanobrevibacter curvatus* sp. nov., isolated from the hindgut of the termite *Reticulitermes flavipes* // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1996. – V. 62. – №. 10. – P. 3620-3631.
117. Lee J., Koo T., Yulisa A., Hwang S. Magnetite as an enhancer in methanogenic degradation of volatile fatty acids under ammonia-stressed condition // *Journal of Environmental Management*. – 2019. – V. 241. – P. 418-426.
118. Li F., Cheng C.C., Zheng J., Liu J., Quevedo R.M., Li J., Walter J. *Limosilactobacillus balticus* sp. nov., *Limosilactobacillus agrestis* sp. nov., *Limosilactobacillus albertensis* sp. nov., *Limosilactobacillus rudii* sp. nov. and *Limosilactobacillus fastidiosus* sp. nov., five novel *Limosilactobacillus* species isolated from the vertebrate gastrointestinal tract, and proposal of six subspecies of *Limosilactobacillus reuteri* adapted to the gastrointestinal tract of specific vertebrate hosts // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2021. – V. 71. – №. 2.
119. Li H., Qu Y., Yang Y., Chang S., Xu J. Microwave irradiation—A green and efficient way to pretreat biomass // *Bioresource Technology*. – 2016. – V. 199. – P. 34-41.
120. Li L., Xu Y., Dai X., Dai L. Principles and advancements in improving anaerobic digestion of organic waste via direct interspecies electron transfer // *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. – 2021. – V. 148. – P. 111367.
121. Li Q., Xu M., Wang G., Chen R., Qiao W., Wang X. Biochar assisted thermophilic co-digestion of food waste and waste activated sludge under high feedstock to seed sludge ratio in batch experiment // *Bioresource Technology*. – 2018. – V. 249. – P. 1009-1016.
122. Li W., Gupta R., Zhang Z., Cao L., Li Y., Show P. L., You S. A review of high-solid anaerobic digestion (HSAD): From transport phenomena to process design // *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. – 2023. – V. 180. – P. 113305.
123. 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. – №. 1. – P. 821-826.

124. Liang N., Neužil-Bunešová V., Tejnecký V., Gänzle M., Schwab C. 3-Hydroxypropionic acid contributes to the antibacterial activity of glycerol metabolism by the food microbe *Limosilactobacillus reuteri* // *Food Microbiology*. – 2021. – V. 98. – P. 103720.
125. Lim E.Y., Tian H., Chen Y., Ni K., Zhang J., Tong Y.W. Methanogenic pathway and microbial succession during start-up and stabilization of thermophilic food waste anaerobic digestion with biochar // *Bioresource Technology*. – 2020. – V. 314. – P. 123751.
126. Lin R., Cheng J., Ding L., Murphy J.D Improved efficiency of anaerobic digestion through direct interspecies electron transfer at mesophilic and thermophilic temperature ranges // *Chemical Engineering Journal*. – 2018. – V. 350. – P. 681-691.
127. Ling Y., Wang H., Fei X., Huang T., Shan Q., Hei D., Jia W. Enhancement effect of γ -irradiation pre-treatment on anaerobic digestion performance of kitchen wastewater // *Journal of Cleaner Production*. – 2022. – V. 330. – P. 129951.
128. Liu H., Xu Y., Li L., Dai X., Dai L. A review on application of single and composite conductive additives for anaerobic digestion: Advances, challenges and prospects // *Resources, Conservation and Recycling*. – 2021. – V. 174. – P. 105844.
129. Liu M., Wei Y., Leng X. Improving biogas production using additives in anaerobic digestion: A review // *Journal of Cleaner Production*. – 2021a. – V. 297. – P. 126666.
130. Liu Q., Ren Z.J., Huang C., Liu B., Ren N., Xing D. Multiple syntrophic interactions drive biohythane production from waste sludge in microbial electrolysis cells // *Biotechnology for Biofuels*. – 2016. – V. 9. – P. 1-10.
131. Liu S. *Batch Reactor, Bioprocess Engineering (Second Edition)*. – Elsevier, 2017. – P. 139-178.
132. Liu Y., Qiao J.T., Yuan X.Z., Guo R.B., Qiu Y.L. *Hydrogenispora ethanolica* gen. nov., sp. nov., an anaerobic carbohydrate-fermenting bacterium from anaerobic sludge // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2014. – V. 64. – №. Pt 5. – P. 1756-1762.
133. 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. – № 1. – P. 171–189.
134. Lovato G., Kovalovszki A., Alvarado-Morales M., Jégliot A.T.A., Rodrigues J.A.D., Angelidaki I. Modelling bioaugmentation: Engineering intervention in anaerobic digestion // *Renewable Energy*. – 2021. – V. 175. – P. 1080-1087.
135. Lovley D.R. Syntrophy goes electric: direct interspecies electron transfer // *Annual Review of Microbiology*. – 2017. – V. 71. – P. 643-664.

136. Lu J.S., Chang J.S., Lee D.J. Adding carbon-based materials on anaerobic digestion performance: A mini-review // *Bioresource Technology*. – 2020. – V. 300. – P. 122696.
137. Lu T., Zhang J., Wei Y., Shen P. Effects of ferric oxide on the microbial community and functioning during anaerobic digestion of swine manure // *Bioresource Technology*. – 2019. – V. 287. – P. 121393.
138. Ma K., Cao Z., Cui Y., Chen T., Shan S., Shi Y., Lv J. Effect of magnetite on anaerobic digestion treating saline wastewater: Methane production, biomass aggregation and microbial community dynamics // *Bioresource Technology*. – 2021. – V. 341. – P. 125783.
139. Mao C., Feng Y., Wang X., Ren G. Review on research achievements of biogas from anaerobic digestion // *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. – 2015. – V. 45. – P. 540-555.
140. McInerney M.J., Bryant M.P., Hespell R.B., Costerton J.W. *Syntrophomonas wolfei* gen. nov. sp. nov., an anaerobic, syntrophic, fatty acid-oxidizing bacterium // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1981. – V. 41. – №. 4. – P. 1029-1039.
141. 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.
142. Meegoda J.N., Li B., Patel K., Wang L.B. A review of the processes, parameters, and optimization of anaerobic digestion // *International Journal of Environmental Research and Public Health*. – 2018. – V. 15. – №. 10. – P. 2224.
143. Meng Q., Liu H., Zhang H., Xu S., Lichtfouse E., Yun Y. Anaerobic digestion and recycling of kitchen waste: a review // *Environmental Chemistry Letters*. – 2022. – V. 20. – №. 3. – P. 1745-1762.
144. Meng X., Sui Q., Liu J., Yu D., Wang Y., Wei Y. Relieving ammonia inhibition by zero-valent iron (ZVI) dosing to enhance methanogenesis in the high solid anaerobic digestion of swine manure // *Waste Management*. – 2020. – V. 118. – P. 452-462.
145. Menzel T., Neubauer P., Junne S. Role of microbial hydrolysis in anaerobic digestion // *Energies*. – 2020. – V. 13. – №. 21. – P. 5555.
146. Mi J., Peng H., Wu Y., Wang Y., Liao X. Diversity and community of methanogens in the large intestine of finishing pig's // *BMC microbiology*. – 2019. – V. 19. – P. 1-9.
147. Miller T. L., Wolin M. J. *Methanosphaera stadtmaniae* gen. nov., sp. nov.: a species that forms methane by reducing methanol with hydrogen // *Archives of Microbiology*. – 1985. – V. 141. – P. 116-122.

148. Nasir I.M., Mohd Ghazi T.I., Omar R. Anaerobic digestion technology in livestock manure treatment for biogas production: a review // *Engineering in Life Sciences*. – 2012. – V. 12. – №. 3. – P. 258-269.
149. Náthia-Neves G., Berni M., Dragone G., Mussatto S.I., Forster-Carneiro T. Anaerobic digestion process: technological aspects and recent developments // *International Journal of Environmental Science and Technology*. – 2018. – V. 15. – P. 2033-2046.
150. Nguyen A.Q., Wickham R., Nguyen L.N., Phan H.V., Galway B., Bustamante H., Nghiem L.D. Impact of anaerobic co-digestion between sewage sludge and carbon-rich organic waste on microbial community resilience // *Environmental Science: Water Research & Technology*. – 2018. – V. 4. – №. 12. – P. 1956-1965.
151. Nguyen L.N., Vu M.T., Johir M.A.H., Pernice M., Ngo H.H., Zdarta J., Nghiem L.D. Promotion of direct interspecies electron transfer and potential impact of conductive materials in anaerobic digestion and its downstream processing-a critical review // *Bioresource Technology*. – 2021. – V. 341. – P. 125847.
152. Nguyen V.K., Chaudhary D.K., Dahal R.H., Trinh N.H., Kim J., Chang S. W., Nguyen D.D. Review on pretreatment techniques to improve anaerobic digestion of sewage sludge // *Fuel*. – 2021. – V. 285. – P. 119105.
153. Nie E., He P., Zhang H., Hao L., Shao L., Lü F. How does temperature regulate anaerobic digestion? // *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. – 2021. – V. 150. – P. 111453.
154. Niederdorfer R., Fragner L., Yuan L., Hausherr D., Wei J., Magyar P., Bürgmann H. Distinct growth stages shaped by an interplay of deterministic and neutral processes are indispensable for functional anammox biofilms // *Water Research*. – 2021. – V. 200. – P. 117225.
155. Nkuna R., Roopnarain A., Rashama C., Adeleke R. Insights into organic loading rates of anaerobic digestion for biogas production: a review // *Critical Reviews in Biotechnology*. – 2022. – V. 42. – №. 4. – P. 487-507.
156. Nobu M.K., Narihiro T., Mei R., Kamagata Y., Lee P.K., Lee P.H., Liu W.T. Catabolism and interactions of uncultured organisms shaped by eco-thermodynamics in methanogenic bioprocesses // *Microbiome*. – 2020. – V. 8. – P. 1-16.
157. Nzila A. Mini review: Update on bioaugmentation in anaerobic processes for biogas production // *Anaerobe*. – 2017. – V. 46. – P. 3-12.
158. Ogugbue C.J., Ebode E.E., Leera S. Electricity generation from swine wastewater using microbial fuel cell // *Journal of Ecological Engineering*. – 2015. – V. 16. – №. 5. – P. 26-33.

159. Oosterkamp M.J., Bauer S., Ibáñez A.B., Méndez-García C., Hong P.Y., Cann I., Mackie R.I. Identification of methanogenesis and syntrophy as important microbial metabolic processes for optimal thermophilic anaerobic digestion of energy cane thin stillage // *Bioresource Technology Reports*. – 2019. – V. 7. – P. 100254.
160. Paritosh K., Yadav M., Chawade A., Sahoo D., Kesharwani N., Pareek N., Vivekanand V. Additives as a support structure for specific biochemical activity boosts in anaerobic digestion: a review // *Frontiers in Energy Research*. – 2020. – V. 8. – P. 88.
161. Park J.H., Kang H.J., Park K.H., Park H.D. Direct interspecies electron transfer via conductive materials: A perspective for anaerobic digestion applications // *Bioresource Technology*. – 2018a. – V. 254. – P. 300–311.
162. Park J.H., Park J.H., Seong H.J., Sul W.J., Jin K.H., Park H.D. Metagenomic insight into methanogenic reactors promoting direct interspecies electron transfer via granular activated carbon // *Bioresource Technology*. – 2018b. – V. 259. – P. 414-422.
163. Park W.J., Ahn J.H. Effects of microwave pretreatment on mesophilic anaerobic digestion for mixture of primary and secondary sludges compared with thermal pretreatment // *Environmental Engineering Research*. – 2011. – V. 16. – №. 2. – P. 103-109.
164. Parshina S.N., Stams A.J.M. *Soehngenia* // *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. – 2015. – P. 1-3.
165. Passos F., Solé M., García J., Ferrer I. Biogas production from microalgae grown in wastewater: effect of microwave pretreatment // *Applied Energy*. – 2013. – V. 108. – P. 168-175.
166. Paudel S.R., Banjara S.P., Choi O.K., Park K.Y., Kim Y.M., Lee J.W. Pretreatment of agricultural biomass for anaerobic digestion: Current state and challenges // *Bioresource Technology*. – 2017. – V. 245. – P. 1194-1205.
167. Peng W., Lü F., Hao L., Zhang H., Shao L., He P. Digestate management for high-solid anaerobic digestion of organic wastes: A review // *Bioresource Technology*. – 2020. – V. 297. – P. 122485.
168. Perman E., Schnürer A., Björn A., Moestedt J. Serial anaerobic digestion improves protein degradation and biogas production from mixed food waste // *Biomass and Bioenergy*. – 2022. – V. 161. – P. 106478.
169. Petropoulos E., Dolfing J., Davenport R.J., Bowen E.J., Curtis T.P. Developing cold-adapted biomass for the anaerobic treatment of domestic wastewater at low temperatures (4, 8 and 15°C) with inocula from cold environments // *Water Research*. – 2017. – V. 112. – P. 100-109.

170. Pore S.D., Engineer A., Dagar S.S., Dhakephalkar P.K. Meta-omics based analyses of microbiome involved in biomethanation of rice straw in a thermophilic anaerobic bioreactor under optimized conditions // *Bioresource Technology*. – 2019. – V. 279. – P. 25-33.
171. Qian M.Y., Li R.H., Li J., Wedwitschka H., Nelles M., Stinner W., Zhou H.J. Industrial scale garage-type dry fermentation of municipal solid waste to biogas // *Bioresource Technology*. – 2016. – V. 217. – P. 82-89.
172. Qiu Y.L., Hanada S., Ohashi A., Harada H., Kamagata Y., Sekiguchi Y. *Syntrophorhabdus aromaticivorans* gen. nov., sp. nov., the first cultured anaerobe capable of degrading phenol to acetate in obligate syntrophic associations with a hydrogenotrophic methanogen // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2008. – V. 74. – №. 7. – P. 2051-2058.
173. Quast C., Pruesse E., Yilmaz P., Gerken J., Schweer T., Yarza P., Glöckner F.O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools // *Nucleic Acids Research*. – 2012. – V. 41. – №. D1. – P. D590-D596.
174. Rabii A., Aldin S., Dahman Y., Elbeshbishy E. A review on anaerobic co-digestion with a focus on the microbial populations and the effect of multi-stage digester configuration // *Energies*. – 2019. – V. 12. – №. 6. – P. 1106.
175. Rago L., Zecchin S., Marzorati S., Goglio A., Cavalca L., Cristiani P., Schievano A. A study of microbial communities on terracotta separator and on biocathode of air breathing microbial fuel cells // *Bioelectrochemistry*. – 2018. – V. 120. – P. 18-26.
176. Rajeshwari K.V., Balakrishnan M., Kansal A., Lata K., Kishore V.V.N. State-of-the-art of anaerobic digestion technology for industrial wastewater treatment // *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. – 2000. – V. 4. – №. 2. – P. 135-156.
177. Rasapoor M., Young B., Brar R., Sarmah A., Zhuang W.Q., Baroutian S. Recognizing the challenges of anaerobic digestion: Critical steps toward improving biogas generation // *Fuel*. – 2020. – V. 261. – P. 116497.
178. Rico C., Montes J.A., Lobo A. Dry batch anaerobic digestion of food waste in a box-type reactor system: Inoculum preparation and reactor performance // *Journal of Cleaner Production*. – 2020. – V. 251. – P. 119751.
179. Rocamora I., Wagland S.T., Casado M.R., Hassard F., Villa R., Peces M., Bajón-Fernández Y. Managing full-scale dry anaerobic digestion: Semi-continuous and batch operation // *Journal of Environmental Chemical Engineering*. – 2022. – V. 10. – №. 4. – P. 108154.

180. Rocha-Meneses L., Zannerni R., Inayat A., Abdallah M., Shanableh A., Ghenai C., Kikas T. Current progress in anaerobic digestion reactors and parameters optimization // Biomass Conversion and Biorefinery. – 2022. – P. 1-24.
181. Romero-Güiza M.S., Vila J., Mata-Alvarez J., Chimenos J.M., Astals S. The role of additives on anaerobic digestion: a review // Renewable and Sustainable Energy Reviews. – 2016. – V. 58. – P. 1486-1499.
182. Roswell M., Dushoff J., Winfree R. A conceptual guide to measuring species diversity // Oikos. – 2021. – V. 130. – №. 3. – P. 321-338.
183. Ryue J., Lin L., Kakar F.L., Elbeshbishy E., Al-Mamun A., Dhar B.R. A critical review of conventional and emerging methods for improving process stability in thermophilic anaerobic digestion // Energy for Sustainable development. – 2020. – V. 54. – P. 72-84.
184. Saady N.M.C., Massé D.I. Psychrophilic anaerobic digestion of lignocellulosic biomass: a characterization study // Bioresource Technology. – 2013. – V. 142. – P. 663-671.
185. Sapci Z. The effect of microwave pretreatment on biogas production from agricultural straws // Bioresource Technology. – 2013. – V. 128. – P. 487-494.
186. Scherzinger M., Kaltschmitt M. Heat induced pre-treatment technologies for lignocellulosic biomass. A comparison of different processes and techniques // Journal of Ecological Engineering. – 2019. – V. 20. – №. 7. – P. 134-146.
187. Scherzinger M., Kaltschmitt M. Thermal pre-treatment options to enhance anaerobic digestibility – A review // Renewable and Sustainable Energy Reviews. – 2021. – V. 137. – P. 110627.
188. Schink B., Stams A.J.M. Syntrophism among prokaryotes // Springer. – Berlin, Heidelberg. – 2013. – P. 471–493.
189. Schlegel K., Müller V. Evolution of Na⁺ and H⁺ bioenergetics in methanogenic archaea // Biochem. Soc. Trans. – 2013. – V. 41. – P. 421–426.
190. Sedighi A., Karrabi M., Shahnava B., Mostafavinezhad M. Bioenergy production from the organic fraction of municipal solid waste and sewage sludge using mesophilic anaerobic co-digestion: An experimental and kinetic modeling study // Renewable and Sustainable Energy Reviews. – 2022. – V. 153. – P. 111797.
191. 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.

192. Sharma D., Mahajan R., Goel G. Insights into direct interspecies electron transfer mechanisms for acceleration of anaerobic digestion of wastes // *International Journal of Environmental Science and Technology*. – 2019. – V. 16. – P. 2133-2142.
193. Shen L., Zhao Q., Wu X., Li X., Li Q., Wang Y. Interspecies electron transfer in syntrophic methanogenic consortia: From cultures to bioreactors // *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. – 2016. – V. 54. – P. 1358-1367.
194. Shin K.S., Kang H. Electron beam pretreatment of sewage sludge before anaerobic digestion // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. – 2003. – V. 109. – P. 227-239.
195. Shrestha P.M., Rotaru A.E. Plugging in or going wireless: strategies for interspecies electron transfer // *Frontiers in Microbiology*. – 2014. – V. 5. – P. 237.
196. Siddique M.N.I., Wahid Z.A. Achievements and perspectives of anaerobic co-digestion: A review // *Journal of Cleaner Production*. – 2018. – V. 194. – P. 359-371.
197. Sikora A., Detman A., Chojnacka A., Blaszczyk M.K. Anaerobic Digestion: I. A common process ensuring energy flow and the circulation of matter in ecosystems. II. A tool for the production of gaseous biofuels // *Ferment. Process*. – 2017. – V. 14. – P. 272–294.
198. Singh D.K., Garg A. A review on hydrothermal pretreatment of sewage sludge: Energy recovery options and major challenges // *Advanced Organic Waste Management*. – Elsevier, 2022. – P. 297-314.
199. Singh J., Suhag M., Dhaka A. Augmented digestion of lignocellulose by steam explosion, acid and alkaline pretreatment methods: a review // *Carbohydrate Polymers*. – 2015. – V. 117. – P. 624-631.
200. Smith K.S., Ingram-Smith C. *Methanosaeta*, the forgotten methanogen? // *Trends Microbiol*. – 2007. – V. 15. – P. 150–155.
201. Sołowski G., Konkol I., Cenian A. Production of hydrogen and methane from lignocellulose waste by fermentation. A review of chemical pretreatment for enhancing the efficiency of the digestion process // *Journal of Cleaner Production*. – 2020. – V. 267. – P. 121721.
202. Song H., Choi O., Pandey A., Kim Y.G., Joo J.S., Sang B.I. Simultaneous production of methane and acetate by thermophilic mixed culture from carbon dioxide in bioelectrochemical system // *Bioresource Technology*. – 2019. – V. 281. – P. 474-479.
203. Sorokin D.Y., Makarova K.S., Abbas B., Ferrer M., Golyshin P.N., Galinski E.A., Ciordia S., Mena M., Merkel A., Wolf Y., Loosdrecht M., Koonin, E.V. Discovery of extremely halophilic, methyl-reducing euryarchaea provides insights into the evolutionary origin of methanogenesis // *Nature Microbiology*. – 2017. – V. 2. – №. 8. – P. 1-11.

204. Soutschek E., Winter J., Schindler F., Kandler O. *Acetomicrobium flavidum*, gen. nov., sp. nov., a thermophilic, anaerobic bacterium from sewage sludge, forming acetate, CO₂ and H₂ from glucose // *Systematic and Applied Microbiology*. – 1984. – V. 5. – №. 3. – P. 377-390.
205. Srisowmeya G., Chakravarthy M., Devi G.N. Critical considerations in two-stage anaerobic digestion of food waste – A review // *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. – 2020. – V. 119. – P. 109587.
206. Stams A.J.M. Metabolic interactions between anaerobic bacteria in methanogenic environments // *Antonie van Leeuwenhoek*. – 1994. – V. 66. – P. 271-294.
207. Stams A.J., De Bok F.A., Plugge C.M., Van Eekert M.H., Dolging J., Schraa G. Exocellular electron transfer in anaerobic microbial communities // *Environmental Microbiology*. – 2006. – V. 8. – №. 3. – P. 371-382.
208. Stams A.J.M., Sousa D.Z., Kleerebezem R., Plugge C.M. Role of syntrophic microbial communities in high-rate methanogenic bioreactors // *Water Sci Technol*. – 2012. – V. 66. – № 2. – P. 352–362.
209. Stams, A.J.M., Plugge, C.M. Electron transfer in syntrophic communities of anaerobic bacteria and archaea // *Nat. Rev. Microbiol*. – 2009. – V. 7. – № 8. – P. 568–577.
210. Sun W.X., Fu S.F., Zhu R., Wang Z.Y., Zou H., Zheng Y. Improved anaerobic digestion efficiency of high-solid sewage sludge by enhanced direct interspecies electron transfer with activated carbon mediator // *Bioresource Technology*. – 2020. – V. 313. – P. 123648.
211. Taconi K.A., Zappi M.E., French W.T., Brown L.R. Methanogenesis under acidic pH conditions in a semi-continuous reactor system // *Bioresource Technology*. – 2008. – V. 99. – №. 17. – P. 8075-8081.
212. Taherzadeh M.J., Karimi K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2008. – V. 9. – №. 9. – P. 1621-1651.
213. Teoh R., Caro E., Holman D.B., Joseph S., Meale S.J., Chaves A.V. Effects of hardwood biochar on methane production, fermentation characteristics, and the rumen microbiota using rumen simulation // *Frontiers in Microbiology*. – 2019. – V. 10. – P. 1534.
214. Tiwari B.R., Rouissi T., Brar S.K., Surampalli R.Y. Critical insights into psychrophilic anaerobic digestion: Novel strategies for improving biogas production // *Waste Management*. – 2021. – V. 131. – P. 513-526.
215. Toczyłowska-Mamińska R., Szymona K., Kloch M. Bioelectricity production from wood hydrothermal-treatment wastewater: enhanced power generation in MFC-fed mixed wastewaters // *Science of The Total Environment*. – 2018. – V. 634. – P. 586-594.

216. Torres M.L., Lloréns M.C.E. Effect of alkaline pretreatment on anaerobic digestion of solid wastes // *Waste Management*. – 2008. – V. 28. – №. 11. – P. 2229-2234.
217. Tyagi V.K., Fdez-Güelfo L.A., Zhou Y., Álvarez-Gallego C.J., Garcia L.R., Ng W.J. Anaerobic co-digestion of organic fraction of municipal solid waste (OFMSW): Progress and challenges // *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. – 2018. – V. 93. – P. 380-399.
218. Van Haandel A., Kato M.T., Cavalcanti P.F., Florencio L. Anaerobic reactor design concepts for the treatment of domestic wastewater // *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*. – 2006. – V. 5. – P. 21-38.
219. Van Steendam C., Smets I., Skerlos S., Raskin, L. Improving anaerobic digestion via direct interspecies electron transfer requires development of suitable characterization methods // *Current Opinion in Biotechnology*. – 2019. – V. 57. – P. 183-190.
220. Veit A., Rittmann D., Georgi T., Youn J.W., Eikmanns B.J., Wendisch V.F. Pathway identification combining metabolic flux and functional genomics analyses: acetate and propionate activation by *Corynebacterium glutamicum* // *Journal of Biotechnology*. – 2009. – V. 140. – №. 1-2. – P. 75-83.
221. Venkiteshwaran K., Bocher B., Maki J., Zitomer D. Relating anaerobic digestion microbial community and process function: supplementary issue: water microbiology // *Microbiology Insights*. – 2015. – V. 8. – №. S2. – P. 33593.
222. Vorregaard M. Comstat2-a modern 3D image analysis environment for biofilms : Technical University of Denmark, DTU, DK-2800 Kgs. Lyngby, Denmark, 2008.
223. Walker D.J.F., Adhikari D.E., Holmes D.E., Ward J.E., Woodard T.L., Nevin K.P., Lovley D.R. Electrically conductive pili from pilin genes of phylogenetically diverse microorganisms // *ISME J*. – 2018. – V. 12. – P. 48-58.
224. Wang H., Li J., Zhao Y., Xu C., Zhang K., Li J., Wang W. Establishing practical strategies to run high loading corn stover anaerobic digestion: Methane production performance and microbial responses // *Bioresource Technology*. – 2020. – V. 310. – P. 123364.
225. Wang P., Yu M., Lin P., Zheng Y., Ren L. Effects of biochar supported nano zero-valent iron with different carbon/iron ratios on two-phase anaerobic digestion of food waste // *Bioresource Technology*. – 2023. – V. 382. – P. 129158.
226. Wang S., Wang Z., Usman M., Zheng Z., Zhao X., Meng X., Cai Y. Two microbial consortia obtained through purposive acclimatization as biological additives to relieve ammonia inhibition in anaerobic digestion // *Water Research*. – 2023. – V. 230. – P. 119583.
227. Wang T., Zhang D., Dai L., Dong B., Dai X. Magnetite triggering enhanced direct interspecies electron transfer: a scavenger for the blockage of electron transfer in anaerobic

- digestion of high-solids sewage sludge // *Environmental Science & Technology*. – 2018. – V. 52. – №. 12. – P. 7160-7169.
228. Wang W., Lee D.J. Direct interspecies electron transfer mechanism in enhanced methanogenesis: A mini-review // *Bioresource Technology*. – 2021. – V. 330. – P. 124980.
229. Wang Z., Hu Y., Wang S., Wu G., Zhan, X. A critical review on dry anaerobic digestion of organic waste: Characteristics, operational conditions, and improvement strategies // *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. – 2023a. – V. 176. – P. 113208.
230. Ward A.J., Hobbs P.J., Holliman P.J., Jones D.L. Optimisation of the anaerobic digestion of agricultural resources // *Bioresource Technology*. – 2008. – V. 99. – №. 17. – P. 7928-7940.
231. Wasserfallen A., Nöling J., Pfister P., Reeve J., Conway de Macario E. Phylogenetic analysis of 18 thermophilic *Methanobacterium* isolates supports the proposals to create a new genus, *Methanothermobacter* gen. nov., and to reclassify several isolates in three species, *Methanothermobacter thermotrophicus* comb. nov., *Methanothermobacter wolfeii* comb. nov., and *Methanothermobacter marburgensis* sp. nov // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2000. – V. 50. – №. 1. – P. 43-53.
232. 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*. – 2011. – V. 34. – №. 4. – P. 260-266.
233. Wonglertarak W., Wichitsathian B. Alkaline pretreatment of waste activated sludge in anaerobic digestion // *Journal of Clean Energy Technologies*. – 2014. – V. 2. – №. 2. – P. 118-121.
234. Wu C., Dong X., Liu X. *Syntrophomonas wolfeii* subsp. *methylbutyratica* subsp. nov., and assignment of *Syntrophomonas wolfeii* subsp. *saponavida* to *Syntrophomonas saponavida* sp. nov. comb. nov // *Systematic and Applied Microbiology*. – 2007. – V. 30. – №. 5. – P. 376-380.
235. Wu Y., Wang S., Liang D., Li N. Conductive materials in anaerobic digestion: From mechanism to application // *Bioresource Technology*. – 2020. – V. 298. – P. 122403.
236. Wu Z., Peng K., Zhang Y., Wang M., Yong C., Chen L., Pan M. Lignocellulose dissociation with biological pretreatment towards the biochemical platform: A review // *Materials Today Bio*. – 2022. – P. 100445.
237. Xiao L., Lichtfouse E., Kumar P.S. Advantage of conductive materials on interspecies electron transfer-independent acetoclastic methanogenesis: A critical review // *Fuel*. – 2021. – V. 305. – P. 121577.

238. Xiao Y., Yang H., Yang H., Wang H., Zheng D., Liu Y., Deng L. Improved biogas production of dry anaerobic digestion of swine manure // *Bioresource Technology*. – 2019. – V. 294. – P. 122188.
239. Xie S., Hai F.I., Zhan X., Guo W., Ngo H.H., Price W.E., Nghiem L.D. Anaerobic co-digestion: A critical review of mathematical modelling for performance optimization // *Bioresource Technology*. – 2016. – V. 222. – P. 498-512.
240. Xie S., Li X., Wang C., Kulandaivelu J., Jiang G. Enhanced anaerobic digestion of primary sludge with additives: Performance and mechanisms // *Bioresource Technology*. – 2020. – V. 316. – P. 123970.
241. Xie Z., Meng X., Ding H., Cao Q., Che Y., Liu X., Li D. The synergistic effect of rumen cellulolytic bacteria and activated carbon on thermophilic digestion of cornstalk // *Bioresource Technology*. – 2021. – V. 338. – P. 125566.
242. Xiong Z., Hussain A., Lee J., Lee H.S. Food waste fermentation in a leach bed reactor: Reactor performance, and microbial ecology and dynamics // *Bioresource Technology*. – 2019. – V. 274. – P. 153-161.
243. Xu H., Chang J., Wang H., Liu Y., Zhang X., Liang P., Huang X. Enhancing direct interspecies electron transfer in syntrophic-methanogenic associations with (semi) conductive iron oxides: Effects and mechanisms // *Science of the Total Environment*. – 2019. – V. 695. – P. 133876.
244. Xu J. *Microwave pretreatment // Processes and Technologies*. – Elsevier. – 2015. – P. 157-172.
245. Xu J., Khanal S.K., Kang Y., Zhu J., Huang X., Zong Y., Xie L. Role of interspecies electron transfer stimulation in enhancing anaerobic digestion under ammonia stress: Mechanisms, advances, and perspectives // *Bioresource Technology*. – 2022. – P. 127558.
246. Yan W., Mukherjee M., Zhou Y. Direct interspecies electron transfer (DIET) can be suppressed under ammonia-stressed condition—reevaluate the role of conductive materials // *Water Research*. – 2020. – V. 183. – P. 116094.
247. Yan W., Wang N., Wei D., Liang C., Chen X., Liu L., Shi J. Bacterial community compositions and nitrogen metabolism function in a cattle farm wastewater treatment plant revealed by Illumina high-throughput sequencing // *Environmental Science and Pollution Research*. – 2021. – V. 28. – P. 40895-40907.
248. Yang S., Chen Z., Wen Q. Impacts of biochar on anaerobic digestion of swine manure: methanogenesis and antibiotic resistance genes dissemination // *Bioresource Technology*. – 2021. – V. 324. – P. 124679.

249. Yin Q., Wu G. Advances in direct interspecies electron transfer and conductive materials: electron flux, organic degradation and microbial interaction // *Biotechnology Advances*. – 2019. – V. 37. – №. 8. – P. 107443.
250. Yin Q., Yang S., Wang Z., Xing L., Wu G. Clarifying electron transfer and metagenomic analysis of microbial community in the methane production process with the addition of ferroferric oxide // *Chemical Engineering Journal*. – 2018. – V. 333. – P. 216-225.
251. Yu Q., Liu R., Li K., Ma R. A review of crop straw pretreatment methods for biogas production by anaerobic digestion in China // *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. – 2019. – V. 107. – P. 51-58.
252. Yu Q., Yang Y., Wang M., Zhu Y., Sun C., Zhang Y., Zhao Z. Enhancing anaerobic digestion of kitchen wastes via combining ethanol-type fermentation with magnetite: Potential for stimulating secretion of extracellular polymeric substances // *Waste Management*. – 2021. – V. 127. – P. 10-17.
253. Yu Z., Zhang B., Yu F., Xu G., Song A. A real explosion: The requirement of steam explosion pretreatment // *Bioresource Technology*. – 2012. – V. 121. – P. 335-341.
254. Yuan H., Zhu N. Progress in inhibition mechanisms and process control of intermediates and by-products in sewage sludge anaerobic digestion // *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. – 2016. – V. 58. – P. 429-438.
255. Zakaria B.S., Dhar B.R. Progress towards catalyzing electro-methanogenesis in anaerobic digestion process: Fundamentals, process optimization, design and scale-up considerations // *Bioresource Technology*. – 2019. – V. 289. – P. 121738.
256. Zellner G., Alten C., Stackebrandt E., Conway de Macario E., Winter J. Isolation and characterization of *Methanocorpusculum parvum*, gen. nov., spec. nov., a new tungsten requiring, coccoid methanogen // *Archives of Microbiology*. – 1987. – V. 147. – №. 1. – P. 13-20.
257. Zhang J., Lu T., Wang Z., Wang Y., Zhong H., Shen P., Wei Y. Effects of magnetite on anaerobic digestion of swine manure: Attention to methane production and fate of antibiotic resistance genes // *Bioresource Technology*. – 2019. – V. 291. – P. 121847.
258. Zhang J., Qi Q., Mao L., He Y., Loh K.C., Tong Y.W. Mixing strategies – Activated carbon nexus: Rapid start-up of thermophilic anaerobic digestion with the mesophilic anaerobic sludge as inoculum // *Bioresource Technology*. – 2020. – V. 310. – P. 123401.
259. Zhang L., Li F., Tsui T.H., Yoh K., Sun J., Loh K.C., Tong Y.W. Microbial succession analysis reveals the significance of restoring functional microorganisms during rescue of failed anaerobic digesters by bioaugmentation of nano-biochar-amended digestate // *Bioresource Technology*. – 2022. – V. 352. – P. 127102.

260. Zhang M., Ma Y., Ji D., Li X., Zhang J., Zang L. Synergetic promotion of direct interspecies electron transfer for syntrophic metabolism of propionate and butyrate with graphite felt in anaerobic digestion // *Bioresource Technology*. – 2019. – V. 287. – P. 121373.
261. Zhang Q., He J., Tian M., Mao Z., Tang L., Zhang J., Zhang H. Enhancement of methane production from cassava residues by biological pretreatment using a constructed microbial consortium // *Bioresource Technology*. – 2011. – V. 102. – №. 19. – P. 8899-8906.
262. Zhang Q., Yang Y., Hou L.A., Zhu H., Zhang Y., Pu J., Li Y. Recent advances of carbon-based additives in anaerobic digestion: A review // *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. – 2023b. – V. 183. – P. 113536.
263. Zhang Y., Li C., Yuan Z., Wang R., Angelidaki I., Zhu G. Syntrophy mechanism, microbial population, and process optimization for volatile fatty acids metabolism in anaerobic digestion // *Chemical Engineering Journal*. – 2023a. – V. 452. – P. 139137.
264. Zhang Y., Zheng S., Hao Q., Wang O., Liu F. Respiratory electrogen *Geobacter* boosts hydrogen production efficiency of fermentative electrotoph *Clostridium pasteurianum* // *Chemical Engineering Journal*. – 2023b. – V. 456. – P. 141069.
265. Zhang Z., Li C., Wang G., Yang X., Zhang Y., Wang R., Miao H. Mechanistic insights into Fe₃O₄-modified biochar relieving inhibition from erythromycin on anaerobic digestion // *Journal of Environmental Management*. – 2023. – V. 344. – P. 118459.
266. Zhao D., Yan B., Liu C., Yao B., Luo L., Yang Y., Zhou Y. Mitigation of acidogenic product inhibition and elevated mass transfer by biochar during anaerobic digestion of food waste // *Bioresource Technology*. – 2021. – V. 338. – P. 125531.
267. Zhao Y., Xu C., Ai S., Wang H., Gao Y., Yan L., Wang W. Biological pretreatment enhances the activity of functional microorganisms and the ability of methanogenesis during anaerobic digestion // *Bioresource Technology*. – 2019. – V. 290. – P. 121660.
268. Zhao Z., Li Y., Zhang Y., Lovley D.R. Sparking anaerobic digestion: promoting direct interspecies electron transfer to enhance methane production // *IScience*. – 2020. – V. 23. – №. 12.
269. Zheng D., Wang H.Z., Gou M., Nobu M.K., Narihiro T., Hu B., Tang Y.Q. Identification of novel potential acetate-oxidizing bacteria in thermophilic methanogenic chemostats by DNA stable isotope probing // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2019. – V. 103. – P. 8631-8645.
270. Zhong Y., He J., Zhang P., Zou X., Pan X., Zhang J. Effects of different particle size of zero-valent iron (ZVI) during anaerobic digestion: performance and mechanism from genetic level // *Chemical Engineering Journal*. – 2022. – V. 435. – P. 134977.

271. Zhou M., Yang H., Zheng D., Pu X., Liu Y., Wang L., Deng L. Methanogenic activity and microbial communities characteristics in dry and wet anaerobic digestion sludges from swine manure // *Biochemical Engineering Journal*. – 2019. – V. 152. – P. 107390.
272. Zhu R., Chen Y., Zhao T., Jiang Q., Wang H., Zheng L., Gu L. Enhanced mesophilic anaerobic co-digestion of waste sludge and food waste by using hematite ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) supported bentonite as additive // *Bioresource Technology*. – 2020. – V. 313. – P. 123603.
273. Ziegler-Devin I., Chrusciel L., Brosse N. Steam explosion pretreatment of lignocellulosic biomass: a mini-review of theoretical and experimental approaches // *Frontiers in Chemistry*. – 2021. – V. 9. – P. 705358.
274. Ziganshin A.M., Ziganshina E.E., Kleinstauber S., Nikolausz M. Comparative analysis of methanogenic communities in different laboratory-scale anaerobic digesters // *Archaea*. – 2016. – V. 2016. – P. 12.
275. Ziganshina E.E., Ibragimov E.M., Vankov P.Y., Miluykov V.A., Ziganshin A.M. Comparison of anaerobic digestion strategies of nitrogen-rich substrates: performance of anaerobic reactors and microbial community diversity // *Waste Management*. – 2017. – V. 59. – P. 160-171
276. Ziganshina E.E., Belostotskiy D.E., Bulynina S.S., Ziganshin A.M. Effect of magnetite on anaerobic digestion of distillers grains and beet pulp: Operation of reactors and microbial community dynamics // *Journal of Bioscience and Bioengineering*. – 2021. – V. 131. – №. 3. – P. 290-298.
277. Ziganshina E.E., Bulynina S.S., Ziganshin A.M. Impact of granular activated carbon on anaerobic process and microbial community structure during mesophilic and thermophilic anaerobic digestion of chicken manure // *Sustainability*. – 2022. – V. 14. – №. 1. – P. 447.