

УДК 579.695;658.567.1

## АКТИВНОСТЬ МЕТАНОГЕННЫХ АРХЕЙ ПРИ КОМПСТИРОВАНИИ ОРГАНИЧЕСКИХ ОТХОДОВ

© 2021 г. В. В. Миронов<sup>1</sup>\*, В. В. Потокина<sup>1</sup>, Е. А. Бочкова<sup>1</sup>,  
А. В. Вантеева<sup>1</sup>, Н. А. Загустина<sup>2</sup>, С. Н. Паршина<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр  
“Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

<sup>2</sup>Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы  
биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

\*e-mail: 7390530@gmail.com

Поступила в редакцию 02.06.2021 г.

После доработки 30.06.2021 г.

Принята к публикации 02.07.2021 г.

Выделены активные мезофильные и термофильные метаногенные консорциумы из компостируемой при экстремально высокой температуре (75–82°C) смеси избыточного ила биологических очистных сооружений сточных вод молочного производства, овощных и древесных отходов в соотношении 3 : 3 : 4 (об./об.) с высоким содержанием сухого вещества (27.5 ± 1.3%). Ускоренный метаногенез и наибольший выход метана (31.7 ± 2.9 ммоль л<sup>-1</sup>) наблюдались при температуре культивирования 55°C. Исследование состава полученных консорциумов методом секвенирования гена 16S рРНК показало наличие метаногенных архей *Methanosarcina thermophila*, *Methanothermobacter thermoautotrophicus*, *Candidatus ‘Methanogranum saenicola’*, *Methanofollis ethanolicus*, а также *Candidatus ‘Methanoplasma termitum’* и *Methanomassiliicoccus luminyensis*. Четыре последние были впервые обнаружены в компостируемых органических отходах. Полученные метаногенные консорциумы были способны осуществлять активный метаногенез и могут быть использованы в биотехнологии метанового сбраживания.

**Ключевые слова:** органические отходы, компостирование, анаэробная обработка, метаногенные археи

**DOI:** 10.31857/S0555109921060106

В связи с постоянным увеличением количества бытовых отходов, требующих переработки и утилизации, создающих серьезные экологические проблемы, все большее внимание привлекают исследования по применению методов их биодegradации, направленных на интенсификацию процесса разложения, повышение безопасности процесса для окружающей среды, а также на получение удобрений [1]. Несмотря на это, по-прежнему преобладает захоронение отходов на полигонах. По различным оценкам, коэффициент извлечения свалочного газа (смесь преимущественно метана, углекислого газа и азота), образующегося на традиционных полигонах, составляет менее 20% [2]. Альтернативным и реализуемым решением для сокращения количества захораниваемых биоразлагаемых отходов является механико-биологическая обработка [3], которая уменьшает реакционную способность, а также массу отходов перед дальнейшей утилизацией.

Компостирование является одним из лучших способов биологической переработки органических отходов с точки зрения минимального воз-

действия конечного продукта – компоста, на окружающую среду [4]. Такая технология полностью отвечает принятому на сегодняшний день в национальных и зарубежных разработках курсу на устойчивое развитие [4, 5]. В настоящее время наибольший интерес представляют исследования по переработке твердых коммунальных отходов (ТКО) методами ускорения и оптимизации процесса компостирования. В связи с этим одним из наиболее перспективных способов является применение аэробно-анаэробной технологии твердофазной биодegradации органических отходов, позволяющей производить не только компост, но и биогаз.

Компостирование является экзотермическим процессом микробного окисления, в котором органический субстрат подвергается биодegradации популяцией микроорганизмов в условиях оптимальной влажности и наличия кислорода. На разных стадиях процесса компостирования (мезофильной, термофильной, остывания и созревания) участвует множество микроорганизмов. Идентифицировано более 2000 известных видов бактерий,

не менее 100 видов грибов, а также археи [1]. В процессе компостирования аэробные микроорганизмы преобразуют биоразлагаемые органические вещества в  $\text{CO}_2$ ,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  и стабильное органическое вещество — компост.

Метан является вторым по значимости парниковым газом после углекислоты, при этом до 70% метана в атмосфере образуется за счёт жизнедеятельности микроорганизмов: аэробных и анаэробных бактерий, метаногенных архей, в том числе при деградации различных отходов [6]. Метаногенез осуществляется археями, представителями филума *Euryarchaeota*, среди которых метаногены, использующие водород, представляют самую большую группу. К ацетокластическим метаногенам, использующим в качестве субстрата ацетат, относятся представители двух родов порядка *Methanosarcinales*: *Methanothrix* (сем. *Methanosaetaceae*) и *Methanosarcina* (сем. *Methanosarcinaceae*). Представители рода *Methanothrix* являются строго ацетокластическими, а представители рода *Methanosarcina* способны использовать в качестве субстратов для образования метана не только ацетат и  $\text{H}_2/\text{CO}_2$ , но и метанол, а также и другие метилированные соединения. Метилированные соединения используют также метилредуцирующие метаногены, не способные диспропорционировать эти субстраты и облигатно зависящие от  $\text{H}_2$  и/или формиата, являющихся донорами электронов для восстановления метильных групп до метана. К ним относятся представители порядков *Methanobacteriales*, *Methanosarcinales*, *Methanomassiliicoccales* [7].

Несмотря на то, что при компостировании твердых отходов вначале субстрат полностью аэрируется кислородом воздуха, в его частицах всё же присутствуют анаэробные зоны, которые формируются из-за дефицита кислорода при интенсивном разложении органических веществ [8], в которых активны облигатно анаэробные метаногенные археи. Наружные слои компостных частиц заселяют аэробные метанотрофные бактерии. Деятельность метанотрофных микроорганизмов может способствовать снижению выбросов метана, а создание при компостировании условий, благоприятных для данной группы, по мнению некоторых авторов, может стать одной из стратегий борьбы с образованием метана [9]. Концентрация образованного метана также снижается при перемешивании компоста, так как при этом разрушаются анаэробные зоны и увеличивается содержание кислорода.

При этом показано, что активность метаногенов при компостировании всё же может оставаться более высокой, чем метанотрофов [10]. Следует отметить, что метаногенные археи более чувствительны, по сравнению с бактериями, к различным ингибиторам, таким как летучие жирные кислоты

(ЛЖК) или аммиак. При этом разные виды метаногенов имеют различную степень устойчивости к ингибиторам [11].

Состав метаногенного сообщества компоста разнообразен и меняется на разных стадиях процесса компостирования в зависимости от температуры [9, 12]. В микробном сообществе компоста может иметь место дифференциация метаногенов по экологическим нишам, как это наблюдается в природных сообществах [9]. Было показано, что в микробном сообществе, осуществляющем анаэробную обработку ТКО, в нестрессовых условиях доминируют *Methanosaeta* — ацетокластические метаногены с более высоким сродством к субстрату. При возникновении неблагоприятных условий преимущество получают археи с миксотрофным типом метаболизма (*Methanosarcina*), которые более устойчивы к действию ингибиторов [11]. Кроме того, предполагается, что при разложении твердых отходов гидрогенотрофные метаногены обладают более высокой стрессоустойчивостью, чем ацетокластические [13].

В работе [14] обнаружены метаногенные археи в навозном компосте не только в термофильной фазе (50–60°C), но и в мезофильной и в стадии созревания (28–35°C). Представители порядка *Methanosarcinales* являются одними из наиболее часто обнаруживаемых метаногенов при компостировании [14]. Возможно, что в хорошо аэрируемых компостных субстратах даже при экстремально высоких температурах (75–82°C), сохраняющихся в течение продолжительного времени (от нескольких суток до нескольких недель), создаются анаэробные микрозоны, в которых сохраняют свою жизнедеятельность метаногенные археи, причём не только термофильные, но и мезофильные, и происходит образование метана.

Цель работы — оценка активности метаногенных архей при компостировании органических отходов с высоким содержанием сухого вещества и получение активных метаногенных консорциумов (накопительных культур) при средних и умеренно высоких температурах культивирования на различных субстратах.

## МЕТОДИКА

За основу для формирования консорциумов была использована методика получения накопительных культур окисляющего ЛЖК психротолерантного микробного сообщества анаэробного биореактора [15]. Для получения накопительных культур метаногенных архей из компостируемых органических отходов применили предварительное твердофазное сбраживание. Эксперимент состоял из трех этапов: (1) твердофазное сбраживание исследуемого субстрата для компостирования, (2) жидкофазное сбраживание с добавлением пита-

тельной среды и метаногенных субстратов для роста различных метаногенных архей, (3) получения накопительных культур метаногенных архей и их исследование.

**Твердофазное сбраживание.** Субстрат для сбраживания отбирали из установки для промышленного компостирования “Климатическая камера” (“Грунт Эко”, Московская область, Россия). Субстрат имел следующий состав: смесь избыточного ила биологических очистных сооружений сточных вод молочного производства, овощных и древесных отходов в соотношении 3 : 3 : 4 (по объему). Содержание сухого вещества в субстрате  $27.5 \pm 1.3\%$  (по массе). Пробы субстрата были отобраны из бурта объемом  $950 \text{ м}^3$  с мембранным светонепроницаемым покрытием и активной аэрацией. До момента отбора пробы субстрат саморазогревался, в течение не менее 7 сут наблюдалась температура  $75\text{--}82^\circ\text{C}$ . На момент отбора пробы срок компостирования составил 12 сут. Температура субстрата при отборе проб на глубине 200 мм от поверхности бурта была  $76.5^\circ\text{C}$ .

Время отбора проб было выбрано исходя из предварительных наблюдений за протеканием активной фазы компостирования. Низкая концентрация кислорода, высокая температура и интенсивное образование летучих дурнопахнущих органических соединений свидетельствовали о возможности одновременного протекания аэробных и анаэробных процессов внутри частиц компостируемого материала. Свободное пространство между буртом и мембранным покрытием было постоянно заполнено газом, выделяющимся при компостировании субстрата. Перед отбором субстрата газоанализатором МАГ-6 П-Т (“Экссис”, Россия) было измерено содержание метана в газе ( $2.2 \pm 0.1$  об. %), а также диоксида углерода ( $10.4 \pm 0.1$  об. %) и аммиака ( $1.0 \pm 0.4 \text{ мг м}^{-3}$ ).

В лабораторных условиях отобранный субстрат  $\sim 100$  г быстро переносили в сывороточные бутылки объемом 500 мл под током азота, герметично закрывали резиновыми пробками, сверху алюминиевыми колпачками и обжимали их на приборе ПОК-1. Флаконы выдерживали в термостате при температуре 28 и  $55^\circ\text{C}$ .

**Жидкофазное сбраживание.** После достижения в пробах концентрации метана более 20.0 об. % (измеренного на хроматографе) проводили следующий этап эксперимента, добавляя во флаконы со сбраживаемой компостной смесью питательные среды и субстраты для роста метаногенных архей по методу [15].

Эксперименты по жидкофазному сбраживанию проводили на модифицированной среде Пфеннига [16] следующего состава (мг/л):  $\text{NH}_4\text{Cl}$  – 330,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  – 250,  $\text{CaCl}_2$  – 168,  $\text{KCl}$  – 330,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 330. В среду добавляли также  $500 \text{ мг л}^{-1}$  дрожже-

вого экстракта,  $2500 \text{ мг л}^{-1}$   $\text{NaHCO}_3$ , микроэлементы по Липперту [17] и витамины по Волину [18]. В качестве редуцирующего агента использовали сульфид натрия ( $0.5 \text{ г л}^{-1}$ ) и цистеин ( $0.5 \text{ г л}^{-1}$ ), рН 6.8–7.0. В качестве метаногенных субстратов использовали стерильные 1.0 М растворы ацетата, метанола или триметиламина (ТМА). Субстраты вносили непосредственно перед засевом по 4 мл на 200 мл среды во флаконы. После добавления среды и субстратов пробы снова ставили на 28 и  $55^\circ\text{C}$  соответственно.

**Получение накопительных культур.** Накопительные культуры получали методом серийных разведений. После накопления метана в газовой фазе бутылей более 25 об. % из флаконов жидкофазного сбраживания отбирали по 2 мл культуры и переносили во флаконы емкостью 120 мл с 18 мл среды того же состава, в которую добавляли по 0.4 мл 1.0 М растворов ацетата, метанола или ТМА ( $20 \text{ ммоль л}^{-1}$ ) и последовательно пересевали во флаконы с соответствующим субстратом до 5–7 разведения, перенося каждый раз по 2 мл (10%) культуральной жидкости.

Для культивирования на  $\text{H}_2/\text{CO}_2$  при приготовлении среды флаконы продували смесью газов  $\text{H}_2/\text{CO}_2$  (80 : 20).

При достижении концентрации метана в газовой фазе флаконов более 10% проводили второй пересев на те же субстраты и при тех же условиях культивирования (28 и  $55^\circ\text{C}$ ), но для подавления роста бактерий добавляли раствор антибиотика ванкомицина ( $100 \text{ мг/л}^{-1}$ ) в 5–7 разведения.

**Анализ концентрации метана.** Метан в газовой фазе флаконов определяли методом газоадсорбционной хроматографии на хроматографе Хроматэк-Кристалл 5000.2 (“Хроматэк”, Россия) с 3 м колонкой, заполненной фазой Carbosieve G (“Sigma-Aldrich”, США). Температура колонки, испарителя и детектора – 140, 100 и  $150^\circ\text{C}$  соответственно. Расход водорода и воздуха – 15 и  $250 \text{ мл мин}^{-1}$  соответственно. Расход газа-носителя (аргона) –  $15 \text{ мл мин}^{-1}$ .

**Анализ содержания ЛЖК (ацетат, пропионат, бутират, валерат) и спиртов (этанол).** ЛЖК в культуральной жидкости при жидкофазном сбраживании определяли методом газожидкостной хроматографии на хроматографе Хроматэк-Кристалл 5000.2 с пламенно-ионизационным детектором, оснащенным автосамплером ДАЖ-2М (“Хроматэк”, Россия), с колонкой Zebron ZB-WAXplus (“Phenomenex”, США). Длина колонки 30 м, внутренний диаметр 0.25 мм. Температура колонки, испарителя и детектора – 110, 180 и  $200^\circ\text{C}$  соответственно. Расходы водорода и воздуха составляли 40 и  $400 \text{ мл мин}^{-1}$  соответственно. Расход газа-носителя (азота) –  $40 \text{ мл мин}^{-1}$ .

**Микроскопическое исследование накопительных культур.** Микроскопические исследования проводили на флуоресцентном микроскопе Axio Lab.A1 FL-LED (“Carl Zeiss”, Германия) с использованием фазово-контрастного объектива при увеличении в 100 раз.

**Молекулярно-генетические исследования.** Выделение ДНК из биомассы полученных метаногенных консорциумов проводили согласно ранее описанному методу [19]. Для проведения полимеразной цепной реакции фрагментов генов 16S рРНК архей использовалась система праймеров 8fa-a1492r [20]. Секвенирование полученных ПЦР-фрагментов проводили по методу [21] с помощью набора реактивов BigDyeTerminatorv.3.1 (“Applied Biosystems”, США) на анализаторе ABI-PRIZM 3730 (“Applied Biosystems”, США) согласно инструкциям производителя. Для секвенирования были использованы следующие праймеры архей:

8fa (5'-TCCGGTTGATCCTGCCGG-3'),  
 A517R (5'-GGTRTTACCGCGGCGGCTGAC-3'),  
 A680F (5'-CSRGGGTAGGGGYGAAATCC-3'),  
 A1041F (5'-GAGAGGWGGTGCATGGCC-3'),  
 Arch915R (5'-GTGCTCCCCGCCAATTCCT-3'),  
 530F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGG-3'),  
 1492R (5'-TACGGYTACSTTGTACGACTT-3').

Первичный анализ сходства нуклеотидных последовательностей изучаемых штаммов проводили с помощью программного пакета BLAST [22] и RDP Classifier [23].

Состав сформированного сообщества также анализировали по количеству копий последовательности гена 16S рРНК. Выделение ДНК из образцов осуществлялось с использованием коммерческого набора для выделения ДНК FastDNA SpinKit (“MPBio”, США) в соответствии с инструкцией производителя. Библиотеки V4 участка гена 16S рРНК для высокопроизводительного секвенирования на системе Illumina MiSeq были приготовлены по схеме, описанной в статье [24]. Для получения ампликонов использовалась следующая система праймеров: прямой праймер (5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTXXXXXXZZZZGTGBCAGCMGCCGCGGTAA-3'), состоящий, соответственно, из “5' Illumina Linker Sequence”, “Index 1”, “Heterogeneity Spacer” [25] и 515F праймерной последовательности [26]; обратный праймер (5'-AATGATACGCGACCACCGAGATCTACACTTTCCTACACGACGCTCTTCCGATCTXXXXXXZZZZGACTACN-VGGTMTCTAATCC-3'), состоящий из “3' Illumina Linker Sequence”, “Index 2”, “Heterogeneity Spacer” и Pro-mod-805R праймерной последовательности [27], соответственно. Для каждого образца ДНК было приготовлено две библиотеки, которые секвенировались параллельно с использованием

набора реагентов MiSeq Reagent Micro Kit v2 (300-cycles) MS-103-1002 (“Illumina”, США) на секвенаторе MiSeq (“Illumina”, США) в соответствии с инструкцией производителя.

**Статистическая обработка результатов.** Эксперименты по твердофазному и жидкофазному сбраживанию проводили в двукратной повторности. Результаты параллельных экспериментов по динамике образования метана и ЛЖК при жидкофазном сбраживании были статистически обработаны. Для определения статистической значимости различий параллельных экспериментов использовали *t*-критерий Стьюдента. Доверительный интервал был выбран с надежностью 90% ( $p = 0.1$ ) [28].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Твердофазное сбраживание.** При твердофазном сбраживании компостной смеси в сывороточных бутылках концентрация метана достигала в термофильных пробах 24.1–36.8 (об. %) на 11 сут эксперимента, в мезофильных пробах — 21.5–26.3 об. % на 14 сут. Это указывало на присутствие в компостной смеси активных метаногенных архей. Так как образование метана было зафиксировано при двух температурах культивирования, можно сделать вывод, что в компостной смеси присутствовали как термофильные, так и мезофильные метаногены, причем последние были способны сохранять свою активность и после термофильной стадии компостирования, что также было показано ранее [14].

**Жидкофазное сбраживание.** При проведении этапа жидкофазного сбраживания при 28°C концентрация метана постепенно возрастала на протяжении всего времени эксперимента в пробах со всеми типами метаногенных субстратов (рис. 1а), достигая максимума к концу культивирования на 25–32 сут. Контролем служили флаконы, куда метаногенные субстраты не добавляли. Из всех исследованных субстратов (добавленных по 20 ммоль л<sup>-1</sup>), максимальная концентрация метана в мезофильных условиях была на ТМА — 31.5 ± 3.9 ммоль л<sup>-1</sup>, что на 51% выше по сравнению с контролем (20.9 ± 1.9 ммоль л<sup>-1</sup>). На метаноле максимальная концентрация метана составила 26.7 ± 4.8 ммоль л<sup>-1</sup> (на 28% выше контроля), на ацетате — 29.8 ± 3.8 ммоль л<sup>-1</sup> (на 43% выше контроля). В работе [29] при обработке смеси пищевых отходов и избыточного активного ила (50 : 50) концентрация метана после 5–7-суточной лаг-фазы постепенно возрастала на протяжении 30 сут эксперимента, при этом стационарная фаза наблюдалась с 20 сут эксперимента. В настоящей работе в мезофильном режиме лаг-фазы не наблюдали ни на одном метаногенном субстрате: концентрации метана возрастали монотонно. Самая высокая скорость роста во время экспоненциаль-

ной фазы была на ТМА (4.7 ммоль л<sup>-1</sup> сут<sup>-1</sup>), в контроле она составляла 1.5 ммоль л<sup>-1</sup> сут<sup>-1</sup>, на метаноле 2.6 и ацетате 3.0 ммоль л<sup>-1</sup> сут<sup>-1</sup> (рис. 1а).

При жидкофазном сбраживании при 55°C на ацетате и ТМА наблюдали короткую лаг-фазу в первые сутки, а затем экспоненциальную фазу роста на протяжении следующих 3 сут, когда скорость образования метана составляла 6.8 ммоль л<sup>-1</sup> сут<sup>-1</sup> на ацетате и 6.4 ммоль л<sup>-1</sup> сут<sup>-1</sup> на ТМА. Скорость образования метана в контроле и на метаноле составила 2.6 и 2.4 ммоль л<sup>-1</sup> сут<sup>-1</sup> соответственно (рис. 1б).

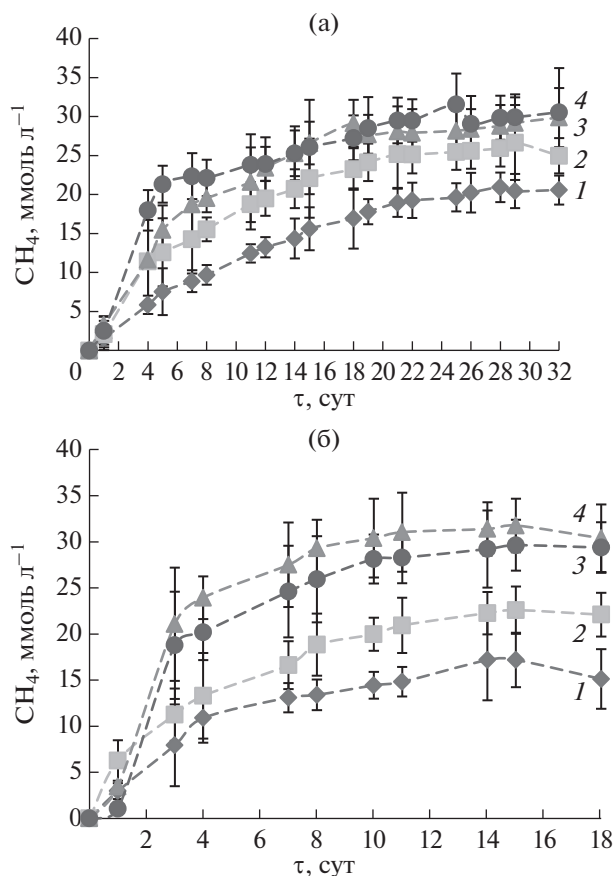
В контрольном варианте и опыте с метанолом рост концентрации метана был постепенным, а лаг-фаза отсутствовала так же, как при температуре 28°C. Максимальная концентрация метана в контрольном эксперименте – 17.2 ± 2.9 ммоль л<sup>-1</sup>, при внесении метанола – 22.6 ± 2.6 ммоль л<sup>-1</sup> (на 31% выше контроля), ТМА – 29.6 ± 2.7 ммоль л<sup>-1</sup> (на 72% выше контроля) и ацетата – 31.7 ± 2.9 ммоль л<sup>-1</sup> (на 84% выше контроля).

Таким образом, в термофильных условиях образование метана достигало максимума за более короткие сроки, чем в мезофильных. По результатам работ [30, 31] повышенная температура способствовала увеличению скорости гидролиза органических веществ и, соответственно, более быстрому образованию метана и его более высокому выходу.

Самые высокие концентрации метана были зафиксированы как при 28, так и при 55°C в экспериментах, в которых в качестве субстратов для роста метаногенных архей были добавлены ацетат и ТМА (рис. 1а и 1б). Можно предположить, что в исследуемой компостной смеси активны как мезофильные, так и термофильные метаногены семейства *Methanosarcinaceae* [32].

Некоторые метаногены способны использовать в качестве субстратов для образования метана не только ацетат и метилированные соединения, но и смесь газов Н<sub>2</sub>/СО<sub>2</sub>, поэтому из флаконов с ацетатом в качестве субстрата были сделаны пересевы также на Н<sub>2</sub>/СО<sub>2</sub> (см. ниже).

**Динамика образования ЛЖК при жидкофазном сбраживании.** Известно, что ЛЖК являются важнейшими промежуточными продуктами при сбраживании органических веществ. Их низкая концентрация считается показателем стабильности процесса сбраживания, а избыточное накопление с последующим снижением рН является одной из наиболее частых причин дестабилизации анаэробных реакторов. В работе [33] было показано, что при концентрациях ацетата, пропионата и бутирата, равных 4125 (70), 2856 (40) и 3456 (40) мг л<sup>-1</sup> (ммоль л<sup>-1</sup>) соответственно, наблюдалась полная дестабилизация процесса сбраживания. По данным [34] добавление 13000 (220.2),



**Рис. 1.** Динамика образования метана в пробах при температуре 28°C (а), 55°C (б): 1 – контроль; 2 – метанол; 3 – ацетат; 4 – ТМА. Результаты представлены как среднее значение ± общая погрешность по результатам двух повторностей.

15000 (172.2) и 3500 (47.9) мг л<sup>-1</sup> (ммоль л<sup>-1</sup>) ацетата, бутирата и пропионата соответственно приводило к двукратному снижению выхода метана. В работе [35] наблюдалось снижение роста метаногенных архей при внесении 951 мг л<sup>-1</sup> (13 ммоль л<sup>-1</sup>) пропионата.

В настоящей работе наблюдали незначительное образование ЛЖК и спиртов при жидкофазном сбраживании. При температуре 28°C концентрация этанола достигала 0.7–8.5, ацетата 4.0–9.5 и пропионата 4.9–7.5 ммоль л<sup>-1</sup>, при 55°C – этанола 1.8–4.9, ацетата 1.9–5.6, пропионата 0.5–1.6 ммоль л<sup>-1</sup>. Очевидно, столь низкие концентрации не оказывали ингибирующего действия на процесс метаногенеза.

Результаты работы [30] показали, что при совместном сбраживании ТКО с активным илом муниципальных очистных сооружений, в первую очередь, в мезофильных условиях наблюдали образование уксусной кислоты, а в термофильных условиях основной ЛЖК была масляная кислота. В настоящей работе образование бутирата не бы-

**Таблица 1.** Результаты секвенирования гена 16S рРНК в накопительных культурах метаногенных архей

| Субстрат                                      | Температура культивирования, °С | Наиболее близкий вид                           | Степень сходства, % |
|---|---------------------------------|--|---------------------|
| ТМА (+ванкомицин)                             | 28                              | <i>Candidatus 'Methanoplasma termitum'</i>     | 96                  |
|   |                                 | <i>Candidatus 'Methanogranum caenicola'</i>    | 100                 |
| H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> (+ванкомицин) | 28                              | <i>Methanofollis ethanolicus</i>               | 98.8                |
| ТМА (+ванкомицин)                             | 55                              | <i>Methanosarcina thermophila</i>              | 100                 |
| Ацетат  | 55                              | <i>Methanomassiliicoccus luminyensis</i>       | 96                  |
| H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> (+ванкомицин) | 55                              | <i>Methanothermobacter thermoautotrophicus</i> | 99                  |

ло обнаружено что, по-видимому, связано с различиями сбраживаемых субстратов.

К концу эксперимента концентрации ЛЖК на всех субстратах при двух температурах культивирования достигали следовых значений, что свидетельствовало не только об активном метаногенезе, но и о протекании процессов синтрофного метаболизма, при котором промежуточные продукты разложились до более простых субстратов вследствие их потребления синтрофными бактериями совместно с метаногенами [32].

Известно также, что соотношение С/Н является одним из важных факторов, который влияет на выход и характер распределения ЛЖК в процессе сбраживания исследуемого субстрата. Ацетат, пропионат и бутират образуются из углеводов, а валерат и капронат – при дезаминировании аминокислот, образующихся во время разложения белков [36]. Анализ ЛЖК и спиртов при жидкофазном сбраживании показал, что в основном образовывались только этанол, ацетат и пропионат. По-видимому, исследуемая компостная смесь, содержала большее количество углеводов, чем белков в соотношении С/Н.

**Получение и исследование накопительных культур метаногенных архей.** В результате первого пересева сброженной культуры при жидкофазном сбраживании на всех субстратах к 28 суткам культивирования концентрация метана во флаконах достигала 10–33 об. % при температуре 28°С и 18–33 об. % при 55°С. Как было описано выше, также был сделан второй пересев накопительных культур с добавлением ванкомицина. Для идентификации архейного состава накопительных культур были проведены молекулярно-генетические исследования, для чего были отобраны пробы из последних разведений второго пересева, в которых наблюдался активный рост, наибольшая концентрация метана и наименьшее морфологическое разнообразие. Результаты секвенирования гена 16S рРНК приведены в табл. 1.

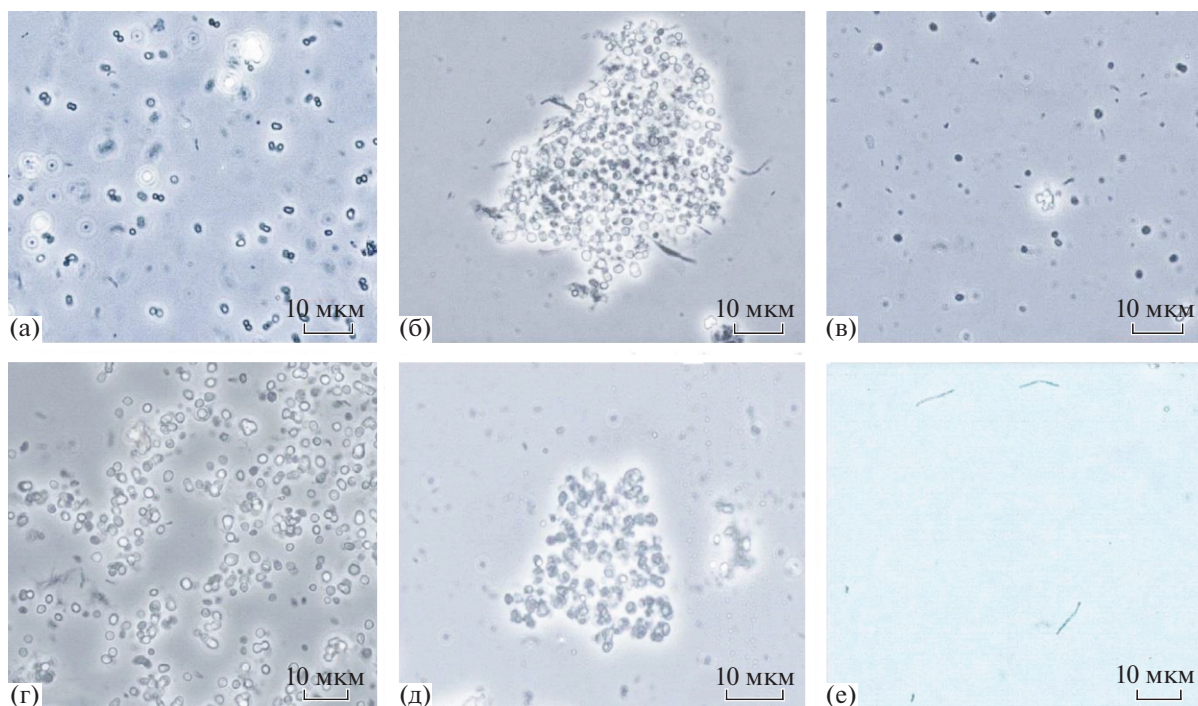
Максимальная концентрация метана в газовой фазе флаконов при 28°С, в которые был внесен ТМА, была достигнута через 49 сут культивирова-

ния в седьмом разведении – 29.7 об. %. В этой накопительной культуре в результате секвенирования гена 16S рРНК были обнаружены представители двух видов архей. Первый флотип принадлежал виду *Candidatus 'Methanogranum caenicola'*, второй флотип имел 96% сходства с *Candidatus 'Methanoplasma termitum'* и, по-видимому, относится к новому виду этого рода-кандидата.

*Ca. 'Methanogranum caenicola'* был выделен ранее из осадка анаэробного метаногенного реактора [37], перерабатывающего ТКО при температуре 55°С, что еще раз подтвердило способность мезофильных метаногенов выживать при высоких температурах. Обнаружение этой культуры в сообществе находит логическое объяснение, так как исследуемая компостная смесь содержала избыточный ил биологических очистных сооружений сточных вод, прошедших как аэробную, так и анаэробную обработку. Тем не менее, *Ca. 'Methanogranum caenicola'* был впервые обнаружен в компостируемых органических отходах.

При микроскопировании проб из этой накопительной культуры были найдены крупные кокцидные клетки, которые могли принадлежать как одному, так и другому виду, так как для обоих характерна подобная морфология (рис. 2а). *Ca. 'Methanoplasma termitum'* является компонентом кишечной микробиоты термитов, но он был обнаружен также и в образцах почв и осадков приливо-отливной зоны [38]. Известно, что этот вид образует метан в присутствии водорода путем восстановления метанола или монометиламина, но не использует ди- и триметиламин [39]. Образование метана *Ca. 'Methanogranum caenicola'* также зависит от присутствия водорода и метанола [37]. Возможно, что обнаруженные микроорганизмы обладают более гибким метаболизмом, чем считалось ранее, и способны использовать для роста и другие метилированные соединения.

В газовой фазе пробы с субстратом H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> при 28°С максимальная концентрация метана составляла 18.3 об. % на 85 сут культивирования. Результаты секвенирования показали, что в этой пробе присутствует археон *Methanofollis ethanolicus* (99%



**Рис. 2.** Морфология клеток накопительных культур, полученных на разных субстратах и при разных температурах: а – ТМА + ванкомицин, 28°С; б, в –  $H_2/CO_2$  + ванкомицин, 28°С; г – ТМА + ванкомицин, 55°С; д – ацетат, 55°С; е –  $H_2/CO_2$  + ванкомицин, 55°С. Масштаб 10 мкм.

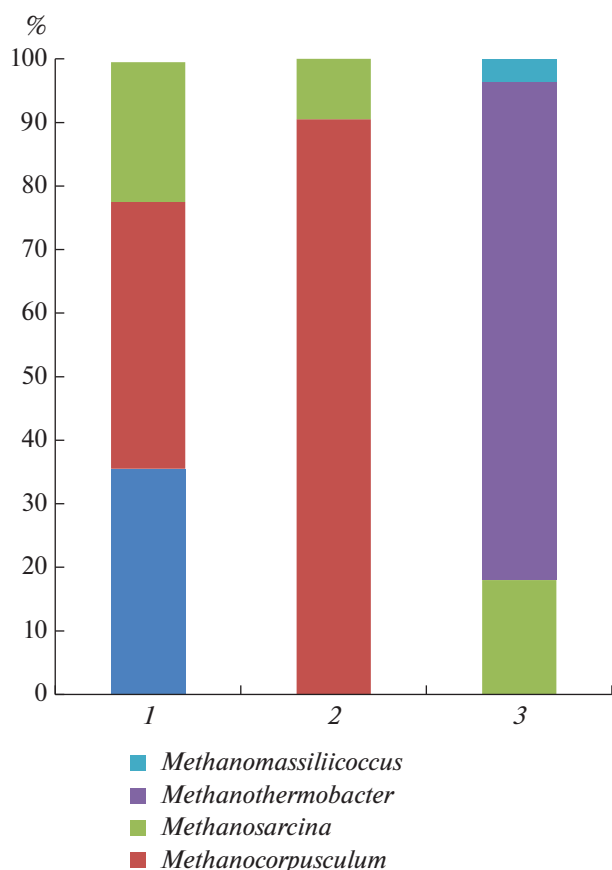
сходства). Этот вид метаногенных архей изначально был выделен из ила лотосовых полей [40], но обнаружен также и в сообществах анаэробных биореакторов, где может быть одним из самых значимых продуцентов метана [41]. Этот метаноген использует в качестве субстрата для роста и образования метана этанол, пропанол, бутанол, формиат и  $H_2/CO_2$ . Клетки *M. ethanolicus* имеют форму неправильных (нерегулярных) кокков и встречаются в культуре поодиночке, что соответствовало морфологии клеток, выделенных в настоящей работе (рис. 2б). Обнаруженные в том же образце агрегаты клеток (рис. 2в), вероятно, относились к другому виду метаногенных архей, который не удалось детектировать в результате секвенирования.

При культивировании при 55°С максимальная концентрация метана была зафиксирована на ТМА на 71 день культивирования и составила 44.8 об. %. В этой пробе присутствовала морфологически однородная культура коккоидных клеток (рис. 2г) – представители вида *Methanosarcina thermophila*. При компостировании органических отходов представители порядка *Methanosarcinales* являются одними из наиболее часто обнаруживаемых метаногенов, активных в том числе на термофильной стадии процесса [12, 42]. Представители рода *Methanosarcina* успешно адаптируются к повышающейся температуре и обнаруживаются в

составе микробного сообщества в течение всего процесса компостирования [42]. Способность использовать разные субстраты для метаногенеза и более высокая устойчивость к ингибиторам, чем у других метаногенных архей, делают их ключевым компонентом метаногенного сообщества, участвующего в обработке органических отходов. Считается, что при анаэробной обработке субстрата с получением биогаза большая часть метана образуется именно благодаря представителям этого рода [11, 43].

Секвенирование накопительной культуры на ацетате при 55°С (максимальная концентрация метана была 30.5 об. %) позволило обнаружить флотип, который имел 96% сходство с *Methanomassiliococcus luminyensis*. Этот вид ассоциирован, главным образом, с кишечной микробиотой человека [44]. Известно, что этот метаноген является мезофильным, для образования метана использует смесь метанола и водорода в качестве субстрата и не растет на остальных типичных для других метаногенов субстратах. Учитывая отдаленную степень родства с ранее описанным видом, можно предположить, что обнаруженный метаноген может быть новым таксоном с иным типом метаболизма. При микроскопировании образца были обнаружены агрегаты коккоидных клеток (рис. 2д).

При культивировании на  $H_2/CO_2$  при 55°С (максимальная концентрация метана 22.8 об. %) в



**Рис. 3.** Состав архейного сообщества консорциумов (относительное количество копий гена 16S рРНК, %) на уровне рода: 1 – метанол + ванкомицин, 28°C; 2 – ацетат + ванкомицин, 28°C; 3 – ацетат, 55°C.

при микроскопировании пробы были обнаружены кокки, реже палочки средней длины (рис. 2е). По данным секвенирования, в этой культуре присутствовал *Methanothermobacter thermoautotrophicus* (табл. 1) (ранее *Methanothermobacter thermoformicium*) [45]. Представители этого вида были найдены в компостируемых органических отходах [12]. Известно, что *M. thermoautotrophicus* использует в качестве субстрата смесь водорода и углекислого газа, что соответствовало условиям культивирования в настоящей работе. Кроме того, ранее отмечалось, что представители этого вида более устойчи-

вы к повышенным концентрациям ЛЖК, по сравнению с другими метаногенами, а накопление ЛЖК в процессе обработки органических отходов стимулирует сукцессию метаногенного сообщества, в результате которой доминирующим видом метаногенов становится *M. thermoautotrophicus* [46]. Несмотря на то, что этот вид метаногенов ассоциируется прежде всего с условиями обитания при повышенных температурах, было показано, что температурный диапазон, в котором *M. thermoautotrophicus* сохраняет активность, достаточно широкий (40–75°C) [47].

Состав некоторых активных консорциумов был также проанализирован с помощью высокопроизводительного секвенирования прокариотического сообщества и были рассчитаны показатели биоразнообразия микроорганизмов для этих консорциумов. Результаты приведены на рис. 3 и в табл. 2.

Согласно числу ОТЕ, значениям индексов Чао1, Симпсона и Шеннона, анаэробное сообщество, полученное в условиях роста на ацетате при 55°C, характеризовалось видовым разнообразием, было представлено значительным числом микроорганизмов, так как ацетат является легкоусвояемым источником углерода и энергии для многих прокариот, в том числе не метаногенных бактерий. Метанол, по-видимому, являлся субстратом для более узкого круга микроорганизмов, поэтому консорциум, полученный на этом субстрате с добавлением ванкомицина при 28°C, имел самые низкие показатели разнообразия относительно других изученных сообществ. Из полученных результатов также очевидно, что ванкомицин оказывал негативное влияние на биоразнообразие сообществ накопительных культур, так как, по-видимому, подавлял рост многих грамположительных бактерий.

В пробе с метанолом с добавлением ванкомицина при температуре культивирования 28°C (максимальная концентрация метана 12.0 об. %) бактериальное сообщество, в основном, было представлено родами *Macellibacteroides* (68%) и *Aminobacterium* (24%). Метаногенные археи в этой пробе составили 0.4% от всего сообщества накопительной культуры и были представлены родом *Methanocorpusculum* (42% архейного сообще-

**Таблица 2.** Разнообразие метаногенных архей в консорциумах

| Проба                | Температура культивирования, °C | Число ОТЕ* | Индекс Чао1** | Индекс Симпсона*** | Индекс Шеннона*** |
|----------------------|---------------------------------|------------|---------------|--------------------|-------------------|
| Метанол + ванкомицин | 28                              | 89         | 188           | 0.51               | 1.07              |
| Ацетат + ванкомицин  | 28                              | 197        | 370           | 0.31               | 2.03              |
| Ацетат               | 55                              | 431        | 945           | 0.20               | 2.81              |

\*, \*\* ОТЕ и индекс Чао1 – показатели многообразия видового богатства. \*\*\* Индексы Шеннона и Симпсона характеризуют, как разнообразие видового состава, так и степень равномерности распределения микроорганизмов в сообществе.



ства), *Methanosarcina* (22%) и *Candidatus Methanogranum* (35%). Последний метаноген был также обнаружен в мезофильной пробе на ТМА (сходство 100% с *Candidatus 'Methanogranum caenicola'*), что подтвердило присутствие метаногенных архей этого рода в исследуемой компостной смеси.

На ацетате с добавлением ванкомицина при температуре культивирования 28°C (максимальная концентрация метана 35 об. %) бактериальное сообщество, в основном, представлено родами *Macellibacteroides* (53%), *Desulfovibrio* (15–16%), *Aminobacterium* (9%) и *Succinispira* (7–8%). Археи составили 2–3% от всего сообщества накопительной культуры и представлены двумя родами: *Methanocorpusculum* (90.5% архейного сообщества) и *Methanosarcina* (9.5%).

На данный момент род *Methanocorpusculum* включает в себя четыре вида метаногенных архей: *Methanocorpusculum parvum*, *Methanocorpusculum sinense*, *Methanocorpusculum havaricum* [48] и *Methanocorpusculum labreanurn* [49]. Основными субстратами для роста и образования метана этими археями являются  $H_2/CO_2$  и формиаат. В нашем исследовании представители этого рода были обнаружены на метаноле и ацетате. Возможно, эти субстраты не только потреблялись метаногенами, но и окислялись синтрофными бактериями с образованием водорода и углекислого газа, которые и были субстратом для метаногенов рода *Methanocorpusculum*.

Как было описано выше, в пробе при температуре культивирования 55°C, где субстратом был ацетат, был детектирован *Methanomassiliicoccus luminyensis* со сходством 96%. Эта проба была также дополнительно проанализирована с помощью высокопроизводительного секвенирования 16S рРНК прокариотического сообщества накопительной культуры. Бактериальное сообщество этой пробы, в основном, представлено родами *Coprothermobacter* (45%), *Acetomicrobium* (21%) и *Anaerolinea* (10–11%). Археи составили 5% от всего сообщества накопительной культуры, они представлены родами *Methanothermobacter* (на 78.5% архейного сообщества), *Methanosarcina* (18%) и *Methanomassiliicoccus* (3.5%). Известно также, что метаногенные археи рода *Methanothermobacter* используют в качестве субстрата  $H_2/CO_2$ , что подтверждает наше предположение о протекании синтрофных процессов окисления ацетата. Как было сказано выше, присутствие в данной накопительной культуре рода метаногенных архей *Methanomassiliicoccus* подтвердили результаты секвенирования гена 16S рРНК, поэтому мы предполагаем, что обнаруженный в данном исследовании метаноген является новым таксоном с иным типом метаболизма. Применение высокопроизводительного секвенирования позволило уточнить и дополнить данные о составе ме-

таногенного сообщества в накопительных культурах.

Археям-метаногенам в исследованных образцах сопутствовали различные виды бактерий. Некоторые из них важны для роста и активности метаногенов, так как связаны с ними симбиотическими или синтрофными взаимосвязями. О присутствии представителей сульфатредуцирующих бактерий в сообществе компостируемых отходов различного происхождения сообщалось ранее. Активность этих микроорганизмов и детектированных нами *Aminobacteria* и *Anaerolinea* также связана с анаэробными микронеонами, подобными тем, что обнаружены в метаногенных гранулах из анаэробных биореакторов [50, 51]. Что касается рода *Coprothermobacter*, в значительных количествах присутствовавшего в одной из проб, то эти термофильные гидролитики связаны с метаногенами синтрофными взаимосвязями [52]. То же самое касается и *Acetomicrobium*, чья ацетогенная активность стимулирует рост ацетокластических метаногенов. Несомненный интерес представляет факт обнаружения в двух пробах значительных количеств гидролитических бактерий *Macellibacteroides*, которые нередко соседствуют с метаногенами в сообществах биореакторов [53].

Таким образом, в результате проведенной работы установлено, что мезофильные метаногены сохраняли свою жизнеспособность после длительного компостирования органических отходов с высоким содержанием сухого вещества (27.5%) при высоких температурах (75–82°C) и были способны образовывать метан при последующем сбраживании. В компостируемой смеси обнаружена высокая активность как термофильных, так и мезофильных метаногенных архей семейства *Methanosarcinaceae*. Термофильные консорциумы, в которых были обнаружены *Methanosarcina thermophila* и *Methanothermobacter thermoautotrophicus*, были наиболее активны в образовании метана. В ходе работы были получены накопительные культуры метаногенных архей, содержащие *Methanosarcina thermophila*, *Methanothermobacter thermoautotrophicus*, *Candidatus 'Methanogranum caenicola'*, *Methanofollis ethanolicus*. Также были получены накопительные культуры, в состав которых входили археи, филогенетически близкие к *Candidatus 'Methanoplasma termitum'* и *Methanomassiliicoccus luminyensis*, возможно, представляющие новые таксоны согласно результатам секвенирования. Из выше упомянутых культур четыре последние были впервые обнаружены в компостируемых органических отходах. Результаты высокопроизводительного секвенирования наиболее интересных проб позволили уточнить и дополнить данные о филогенетическом составе микробного сообщества. Полученные активные консорциумы (накопительные культуры) метаногенных архей будут исследованы в дальнейшем с целью их ис-

пользования в биотехнологии метанового сбраживания органических отходов, в том числе компостируемых, для интенсификации и увеличения выхода биогаза.

Работа выполнена с использованием научного оборудования ЦКП “Биоинженерия” (ФИЦ Биотехнологии РАН).

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта РФФИ мк-18-29-25035.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Миронов В., Бочкова Е., Ганнесен А., Вантеева А., Русскова Ю., Ножевникова А. // Микробиология. 2020. Т. 89. № 4. С. 474–487.
2. Xu Q., Jin X., Ma Z., Tao H., Ko Jae H. // Biores. Technol. 2014. V. 168. P. 92–96.
3. Di Maria F., Micale C., Sisani L., Rotondi L. // Waste Manag. 2016. V. 55. P. 49–60.
4. Sagdeeva O., Krusir G., Tsykalo A., Shpyrko T., Leuenberger H. // J. Food Science and Technology. 2018. V. 11. № 4. P. 43–49.
5. Onwosi C.O., Igbokwe V.C., Odimba J.N., Eke I.E., Nwankwoala M.O., Iroh I.N., Ezeogu L.I. // J. Environ. Manag. 2017. V. 190. P. 140–157.
6. Conrad R. // Pedosphere. 2020. V. 30. № 1. P. 25–39.
7. Ножевникова А., Миронов В., Бочкова Е., Лутти Ю., Русскова Ю. // Прикл. биохимия и микробиология. 2019. Т. 55. № 3. С. 211–221.
8. Yang F., Li G., Shi H., Wang Y. // Waste Manag. 2015. V. 36. P. 70–76.
9. Chen R., Wang Y., Wei S., Wang W., Lin X. // FEMS Microbiol. Ecol. 2014. V. 90. № 3. P. 575–586.
10. Ge J., Huang G., Li J., Han L. // Waste Manag. 2018. V. 78. P. 135–143.
11. Capson-Tojo G., Trably E., Rouez M., Crest M., Bernet N., Steyer J.P., Delgenès J.P., Escudé R. // Waste Manag. 2018. V. 76. P. 423–430.
12. Thummes K., Kämpfer P., Jäckel U. // Systematic and Applied Microbiology. 2007. V. 30. № 5. P. 418–429.
13. Yang S., Li L., Peng X., Song L. // Biores. Technol. 2021. V. 320. Part A. P. 124359.
14. Safika S., Aditiawati P., Akhmaloka A. // J. Pure and Applied Microbiology. 2014. V. 8. № 4. P. 2837–2844.
15. Паршина С.Н., Ермакова А.В., Шатилова К.А. // Микробиология 2011. Т. 80. № 1. С. 53–62.
16. Pfennig N. // Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. Suppl. 1965. V. 1. P. 179–189.
17. Pfennig N., Lippert K.D. // Arch. Microbiol. 1966. V. 55. P. 245–246.
18. Wolin E.A., Wolin M.J., Wolfe R.S. // J. Biol. Chem. 1963. V. 238. P. 2882–2886.
19. Бульгина Е.С., Кузнецов Б.Б., Марусина А.И., Кравченко И.К., Быкова С.А., Колганова Т.В., Гальченко В.Ф. // Микробиология 2002. Т. 71. № 4. С. 500–508.
20. Колганова Т.В., Кузнецов Б.Б., Турова Т.П. // Микробиология 2002. Т. 71. № 2. С. 283–286.
21. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. // Proceedings of the National academy of sciences. 1977. V. 74. № 12. P. 5463–5467.
22. Camacho C., Coulouris G., Avagyan V., Ma N., Papadopoulos J., Bealer K., Madden T.L. // BMC Bioinformatics. 2009. V. 10. P. 421.
23. Chen M.L., Tsen H.Y. // J. Appl. Microbiol. 2002. V. 92. P. 912–919.
24. Gohl D., MacLean A., Hauge A., Becker A., Walek D., Beckman K. // Protocol Exchange 2016. <https://doi.org/10.1038/protex.2016.030>
25. Fadrosch D., Ma B., Gajer P., Sengamalay N., Ott S., Brotman R., Ravel J. // Microbiome. 2014. V. 2. № 1. P. 6.
26. Hugerth L.W., Wefer H.A., Lundin S., Jakobsson H.E., Lindberg M., Rodin S., Engstrand L., Andersson A.F. // Appl. Environ. Microbiol. 2017. V. 80. P. 5116–5123.
27. Меркель А., Тарновецкий И., Подосокорская О., Тоцаков С. // Микробиология 2019. Т. 88. № 6. С. 655–664.
28. Strode P., Brokaw A. Using biointeractive resources to teach Mathematics and Statistics in Biology. P Strode Brokaw. 2015. P. 39
29. Gu J., Liu R., Cheng Y., Stanisavljevic N., Li L., Djatkov D., Peng X., Wang X. // Biores. Technol. 2020. V. 301. Art. № 122765.
30. Arras W., Hussain A., Hausler R., Guiot S.R. // Waste Manag. 2019. V. 87. P. 279–287.
31. Basinas P., Rusín J., Chamrádová K. // Environ. Research. 2021. V. 192. Art. № 110202.
32. Ножевникова А., Русскова Ю., Лутти Ю., Паршина С., Журавлева Е., Никитина А. // Микробиология. 2020. Т. 89. № 2. С. 131–151.
33. Wang Y., Zhang Y., Wang J., Meng L. // Biomass and Bioenergy. 2009. V. 33. № 5. P. 848–853.
34. Dogan T., Ince O., Oz N.A., Ince B.K. // J. Environmental Science and Health. 2005. V. 40. № 3. P. 633–644.
35. Demirel B., Yenigün O. // Environmental Technology. 2002. V. 23. № 10. P. 1179–1187.
36. Rughoonundun H., Mohee R., Holtzapple M.T. // Biores. Technol. 2012. V. 112. P. 91–97.
37. Iino T., Tamaki H., Tamazawa S., Ueno Y., Ohkuma M., Suzuki K., Igarashi Y., Haruta S. // Microbes Environ. 2013. V. 28. № 2. P. 244–250.
38. De La Cuesta-Zuluaga J., Spector T.D., Youngblut N.D., Ley R.E. // Msystems. 2021. V. 9. № 6(1). Art. № e00939-20. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00261-19>
39. Lang K., Schuldes J., Klingl A., Poehlein A., Daniel R., Brunea A. // Appl. Environ. Microbiol. 2015. V. 81. P. 1338–1352.
40. Imachi H., Sakai S., Nagai H., Yamaguchi T., Takai K. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2009. V. 59. P. 800–805.
41. Karabey B., Daglioglu S. T., Azbar N., Ozdemir G. // J. Environmental Science and Health. 2019. Part A. V. 54. № 13. P. 1348–1355.
42. Yamamoto N., Nakai Y. // Advances in Environmental Microbiology. 2019. V. 6. P. 151–172
43. Kurade M.B., Saha S., Salama E.S., Patil S.M., Govindwar S.P., Jeon B.H. // Biores. Technol. 2019. V. 272. P. 351–359.

44. Dridi B., Fardeau M.L., Ollivier B., Raoult D., Drancourt M. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2012. V. 62. P. 1902–1907.
45. Touzel J.-P., Macario E., Nölling J., De Vos W., Zhilina T., Lysenko A. // International J. Systematic Bacteriology. 1992. V. 42. P. 408–411.
46. Lin L., Yu Z., Li Y. // Biores. Technol. 2017. V. 241. P. 1027–1035.
47. Liu C., Mao L., Zheng X., Yuan J., Hu B., Cai Y., Xie H., Peng X., Ding X. // Microbiology Open. 2019. V. 8. № 5. P. Art. № e00715.
48. Zellner G., Stackebrandt E., Messner P., Tindall B., Macario E., Kneifel H., Sleytr U., Winter J. // Arch. Microbiol. 1989. V. 151. P. 381–390.
49. Zhao Y., Boone D., Mah R., Boone J., Xun L. // Int. J. Syst. Bacteriol. 1989. V. 39. P. 10–13.
50. Zhao Y., Jiang B., Tang X., Liu S. // Science of the Total Environment. 2019. V. 687. P. 50–60.
51. Trego A. C., Galvin E., Sweeney C., Dunning S., Murphy C., Mills S., Nzeteu C., Quince C., Colleen S., Ijaz U., Collins G. // Front. Microbiol. 2020. V. 11. P. 1126.
52. Sasaki K., Morita M., Sasaki D., Nagaoka J., Matsumoto N., Ohmura N., Shinozaki H. // J. Biosci. Bioeng. 2011. V. 112. № 5. P. 469–472.
53. Xu Q., Liu X., Wang D., Liu Y., Wang Q., Ni B. J., Li H. // Biores. Technol. 2019. V. 284. P. 456–465.

## Activity of Methanogenic Archaea during Composting of Organic Waste

V. V. Mironov<sup>a,\*</sup>, V. V. Potokina<sup>a</sup>, E. A. Botchkova<sup>a</sup>, A. V. Vanteeva<sup>a</sup>,  
N. A. Zagustina<sup>b</sup>, and S. N. Parshina<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Winogradsky Institute of Microbiology, Federal Research Center “Fundamentals of Biotechnology”  
of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

<sup>b</sup> Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Center “Fundamentals of Biotechnology”  
of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

\*e-mail: 7390530@gmail.com

Composting at extremely high temperature (75–82°C) of mixture of excessive sludge of biological wastewater treatment facilities of dairy production, vegetable and wood waste in a ratio of 3 : 3 : 4 (by volume) with a high amount of dry substance (27.5%) allowed to isolate active mesophilic and thermophilic methanogenic consortia. Dynamics of methane formation at liquid phase fermentation of studied mixture was investigated. Accelerated methanogenesis and the highest yield of methane ( $31.7 \pm 2.9 \text{ mmol L}^{-1}$ ) were observed at culturing at 55°C. Analysis of volatile fatty acid production at liquid phase fermentation showed that their amount was low ( $<10 \text{ mmol L}^{-1}$ ). Such amount could not inhibit methanogenesis regardless of the applied substrates and temperature conditions. 16S rRNA sequencing of the received consortia showed the presence of methanogenic archaea *Methanosarcina thermophila*, *Methanothermobacter thermoautotrophicus*, *Candidatus* ‘Methanogranum caenicola’, *Methanofollis ethanolicus*. Consortia also included archaea that represent putative new taxa phylogenetically close to *Candidatus* ‘Methanoplasma termitum’ and *Methanomassiliicoccus luminyensis*. Of the above mentioned methanogenic archaea, the least four were found in composting organic waste for the first time. Received consortia are able to conduct active methanogenesis and can be applied as an inoculum at anaerobic treatment of organic wastes, including composting wastes, in order to intensify and increase the yield of biogas.

**Keywords:** organic waste, composting, anaerobic treatment, methanogenic archaea